

ACTA PATHOLOGICA ET MICROBIOLOGICA
SCANDINAVICA
VOL. XIX

ACTA PATHOLOGICA ET MICROBIOLOGICA SCANDINAVICA

REDACTORES

J. FORSSMAN
LUND

H. HOLTH
OSLO

K. A. JENSEN
KØBENHAVN

POUL MØLLER
KØBENHAVN

OSV. RENKONEN
(antea STRENG)
HELSINGFORS

E. SJÖVALL
LUND

GEORG WAALER
OSLO

AXEL WALLGREN
HELSINGFORS

REDIGENDA CURAVIT

TAGE KEMP
KØBENHAVN

COLLABORANT

H. BERGSTRAND
Stockholm

HARRY CASTRÉN
Helsingfors

M. CHRISTIANSEN
København

R. FAHRAEUS
Uppsala

A. F. FOLGER
København

F. HENSCHEN
Stockholm

G. KLING
Stockholm

L. KREYBERG
Oslo

TH. MADSEN
København

J. A. MURTO
Helsingfors

C. NYBERG
Helsingfors

A. PETTERSON
Stockholm

TH. M. VOGELSSANG
Bergen



VOL. XIX.

1942.

EINAR MUNKSGAARD · KØBENHAVN
MCMLXII

Printed in Denmark.

H. P. Hansens Bogtr., Kbhvn.

ÜBER SERUMFÄLLE.

EIN TODESFALL NACH PROPHYLAKTISCHER TETANUS-ANTITOXIN-INJEKTION.

Von Arne Gammelgaard.

(Eingegangen bei der Redaktion am 27. 3. 1941).

Führt man parental einem Menschen artfremde Protein-
stoffe zu — in Tierimmunseren für prophylaktische und kura-
tive Behandlung von Infektionskrankheiten (z. B. Tetanus,
Diphtherie, Pneumonie) oder als unspezifische Proteinthera-
pie (z. B. Milchtherapie) — so entstehen in gewissen Fällen
Nebenwirkungen, die klinisch in zwei Formen erscheinen:
Serumshock und Serumkrankheit.

Der Serumshock, der mehr oder weniger akut verlaufen
und spurlos ausklingen oder in einzelnen Fällen im Laufe
von wenigen Minuten bis auf ein paar Stunden letal enden
kann, ist in der Hauptsache durch Kreislaufstörungen (schnel-
len Blutdruckfall, kleinen frequenten Puls, Blässe der Haut
und der Schleimhäute), Atembeschwerde (Dyspnoe, Zyanose)
und Kollaps (Hypothermie, Bewusstlosigkeit) gekennzeichnet;
in einzelnen Fällen hat man Erbrechen, Diarrhoe, Gesichts-
ödem und Lungenödem beobachtet. Ferner wird der Serum-
shock dadurch charakterisiert, dass die Symptome sich in
unmittelbarem Anschluss an die Injektion entwickeln, und
zwar am schnellsten und am gewaltigsten bei der intravenösen
Applikation, wo man während der Injektion die Entwicklung
eines tödlich verlaufenden Shocks beobachtet hat; aber auch

die subcutane Applikation kann einen augenblicklich eintretenden, lebensgefährlichen Shock verursachen (*Dean*).

Serumshocks mit tödlichem Verlauf sind äusserst selten. *Park* (cit. *Lamson*), der grosse statistische, 350.000 Fälle umfassende Untersuchungen vorgenommen hat, die mit Diphtherieserum behandelt worden waren, führt an: 1 von 70.000. *Lamson* hat 1924 die in der Literatur referierten Todesfälle durch Seruminjektion in einer Periode von 28 Jahren gesammelt. Es handelt sich um insgesamt 41 Fälle. Später sind ferner einzelne Fälle referiert worden (*Bullowa, Hardouin, Fournet, Mazel & Guilleminet, Moon*).

Die klinischen Symptome des Serumshocks bei Menschen sind den Reaktionen sehr ähnlich, die bei Tieren mit *experimentell hervorgerufenem anaphylaktischem Shock* beobachtet wurden. Dies gilt besonders für die Symptome beim Hunde, aber auch in gewissem Grade bei Kaninchen und Meerschweinchen. Beim Hunde kennt man nur einen protrahierten Shock, der letal enden kann, frühestens im Laufe von ca. einer halben Stunde. Die Symptome rühren von einem schnellen Blutdruckfall peripheren Ursprunges her. Anfangs ist das Tier unruhig, hat Abgang von Urin und Fäkalien, bisweilen Tenesmie mit blutigen Diarrhoen; ziemlich schnell tritt eine Muskelschwächung ein, und das Tier fällt in einen komatösen Zustand. Bei der Obduktion findet man Blutüberfüllung der Abdominalorgane, besonders der Leber, subseröse und submucöse Blutungen im Darm und kapillare Hämorrhagien in Medulla renis. In der Lunge findet man Hyperämie, Hämorrhagien und akute emphysematöse Änderungen. Bei Mikroskopie werden Degenerationsänderungen in den Leberzellen nachgewiesen.

Der anaphylaktische Shock bei Meerschweinchen hat einen akuten Verlauf mit schweren respiratorischen Störungen. Bei Autopsie findet man die Lunge maximal aufgebläht, gewöhnlich ohne Ödem oder Hämorrhagien; mikroskopisch ist die Bronchialmuskulatur maximal kontrahiert. In den übrigen Organen findet man Hyperämie und kleinere Blutungen auf der Oberfläche. Bei den Meerschweinchen kann auch ein protrahierter Shock auftreten, der dem des Hundes sehr ähnlich ist und sich ebenfalls durch Blutdruckfall peripheren Ursprunges charakterisieren lässt.

Bei dem Kaninchen gibt es sowohl einen akuten, als einen protrahierten Shock, der sich durch eine heftige Dyspnoe und durch Symptome eines starken Blutdruckfalles zeigt. Als ein besonderer Obduktionsbefund wird eine Verdickung (Spasme) in den Zweigen

der Arteria pulmonalis, mit Dilatation und Blutüberfüllung der rechten Seite des Herzens nachgewiesen.

Zum Vergleich mit diesen bei Tieren gefundenen Organänderungen liegen nur wenige obduzierte Fälle von Menschen vor, die im Serumshock verstorben sind. Bullowa hat 1930 13 Fälle gesammelt und referiert gleichzeitig einen Fall, den er selbst beobachtet hat. Später sind noch einzelne Fälle referiert worden (Fournet, Mazel & Guilleminet, Moon).

Die Sektionsbefunde waren von recht verschiedener Art, doch waren sie in der Hauptsache den Organänderungen bei den erwähnten Tieren sehr ähnlich, in einzelnen Fällen beinahe mit diesen identisch (Boughton, Bullowa, Dean). In zwei Fällen fand man normale Verhältnisse, abgesehen von subpericardialen Blutungen. In den übrigen Fällen fand man kapillare Hyperämie mit Ödem, in den verschiedenen Organen variierend ausgedrückt. In 4 Fällen war die Hyperämie besonders in die Leber lokalisiert, und einer dieser 4 Fälle zeigte ausserdem bei Mikroskopie degenerative Leberzellenänderungen (Dean). In zwei Fällen fand man Kapillärhämorrhagien in den Nieren (Fournet, Moon) und in einem Fall intestinale Hämorrhagien. In dem von Boughton referierten Fall wird akutes Lungenemphysem mit Ruptur der Alveolewände und Kontraktion der Bronchioli mit Verengung von Lumen als wesentlicher Obduktionsbefund nachgewiesen. Bullowa fand muskuläre Verdickung der Wände in Zweigen der Arteria pulmonalis, Dilatation der rechten Herzhälfte und akutes Emphysem. An Änderungen im Gehirn ist nur in einem Fall Hyperämie angegeben.

Der Serumshock ist somit in klinischen Symptomen und pathologisch-anatomischen Befunden in hohem Grade dem anaphylaktischen Shock bei Tieren ähnlich und wird deshalb gewöhnlich als eine anaphylaktische Reaktion aufgefasst, auf einer Antigen-Antistoffbindung beruhend, die vor allen Dingen eine Beeinflussung der Kapillaren mit Tonusherabsetzung und vergrösserter Permeabilität und in einzelnen Fällen Kontraktion der glatten Muskulatur in der Arteria pulmonalis und in den Bronchien bewirkt.

Der Serumshock entwickelt sich am häufigsten bei Menschen, die zum ersten Mal in ihrem Leben eine Seruminjektion erhalten, und wahrscheinlich liegt seiner Entwicklung eine originäre Überempfindlichkeit zu Grunde. Eine solche primäre Überempfindlichkeit für das in der Therapie gewöhn-

lich verwendete Serum, das Pferdeserum, ist nach *Ustvedt* selten (1 von 18.000). Unter den 41 von *Lamson* referierten Fällen lagen in 14 Fällen anamnestiche Berichte von Überempfindlichkeit in Form von Asthma, Heufieber u. ä. vor.

Die Angaben über die Bedeutung der wiederholten Seruminjektion für die Entwicklung von Shock sind verschieden. *Ustvedt* führt an, er habe nach intramuskulärer Reinjektion nie einen entwickelten Shock gesehen, und *Park* meint, dass selbst intravenöse Reinjektion keinen Shock hervorruft. *Schnittelhelm* dagegen hat Shock mit tödlichem Verlauf nach einer wiederholten Seruminjektion gesehen, wo die erste Injektion vertragen worden war, und in *Lamson's* Gesamtmaterial wurde über 8 Fälle berichtet, dass die Patienten früher ohne wesentliche Beschwerden Seruminjektion erhalten hatten. Es wird dagegen im allgemeinen angenommen, dass Reinjektionen bedeutend öfter Serumkrankheit verursachen als die erste Seruminjektion, und dass dabei die Serumkrankheit schneller und oft mit schweren Symptomen eintritt.

Serumkrankheit ist ein Symptomkomplex, das erst etwa 8 Tage nach der Serumeingebung anfängt. Die Symptome entwickeln sich weit schleichender als beim Serumshock und umfassen Urticaria, Hautjucken, Gelenk-Muskelschmerzen, Fieber, Ödem und verminderte Ausscheidung von NaCl. und Wasser. Am konstantesten tritt Urticaria auf, dann folgen Fieber, Gelenkschmerzen und Ödem (*Schnittelhelm*). Die Krankheit ist gewöhnlich von kurzer Dauer und hat einen milden Verlauf.

Von Pirquet und *Schick* (cit. *Doerr*), die die Serumkrankheit beschrieben haben, betonen den anaphylaktischen Charakter der Krankheit. Sie sahen im Auftreten der Krankheit am 8. bis zum 10. Tag einen Ausdruck dafür, dass der Organismus zu diesem Zeitpunkt so viel Antistoff gebildet hatte, dass die Reaktion mit dem in der Blutbahn noch zirkulierenden Antistoff imstande war, die obenerwähnten Symptome hervorzurufen. Bei Reinjektion konnten die Symptome als eine »sofortige Reaktion« auftreten, wenn nur 12 Tage bis 2 Monate nach der ersten Injektion verlaufen waren, indem

dann Antistoff für sofortige Reaktion mit dem zugeführten Antigen in der Blutbahn vorhanden war. Waren mehr als 2 Monate bis Jahre verlaufen, so trat die sogenannte »beschleunigte Reaktion« auf, weil der Organismus nach der ersten Injektion in einer Art Bereitschaft war und deshalb imstande war, den Antistoff schneller zu erzeugen.

Die Häufigkeit der Serumkrankheit sollte also zum Teil von denselben Faktoren abhängig sein wie die Antistoff — erzeugung bei Versuchstieren, d. h. von der injizierten Menge, der Art der Applikation und den individuellen Unterschieden. Es hat sich auch gezeigt, dass intravenöse Injektion von grossen Mengen Pferdeserum in bis zu 90 % der Fälle die Serumkrankheit hervorrufen kann. Bei kleineren Dosen und bei subcutaner oder intramuskulärer Injektion fällt der Prozentsatz bedeutend. *Schaer* gibt z. B. Serumkrankheit in 10 % der Fälle nach prophylaktischer Injektion von Tetanusantitoxin an. Die stark schwankende Häufigkeit von Serumkrankheit, die auch hierzulande beobachtet worden ist (*Thune Andersen, Heckscher, Nissen*), ist vielleicht auf obige Faktoren zurückzuführen.

Wie angeführt, nimmt die Serumkrankheit gewöhnlich einen milden Verlauf. In einzelnen Fällen ist jedoch *Todesfall* während der Serumkrankheit nach grossen, intravenösen Serumdosen in der Diphtherie- und Pneumonietherapie referiert worden (*Thune Andersen, Bullowa, Heckscher, Borck Madsen*); als wesentlich mitwirkende Ursache zum Eintritt des Todes in diesen Fällen kann die Krankheit selbst jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Das angeführte Auftreten von Serumshock und Serumkrankheit im Anschluss an die Injektion, bzw. etwa 8 Tage danach, gilt nur als Hauptregel, indem man sowohl Shock nach mehreren Tagen als auch Serumkrankheit in engem Anschluss an die Seruminjektion beobachtet hat. In den Fällen, wo man spät auftretende Shocksymptome bemerkt hat (*Fawsett & Ryle, Scholtz*), waren gleichzeitig Symptome von Serumkrankheit vorhanden. Dies gilt auch für zwei von

Schnittelhelm beobachtete Fälle von Spätschock mit tödlichem Ausgang.

Im gegenwärtigen Institut lag neulich ein *tödlicher Fall von Serumkrankheit* 7 Tage nach einer prophylaktischen Injektion von *Tetanusantitoxin* zur Obduktion vor.

Aus dem Sektionsbericht (J. Nr. D. 177/40) geht hervor:

Ein 42-jähriger Mann, Porten in einem Kopenhagener Krankenhaus, rannte eines Abends während der Verdunkelung mit der Stirn gegen einen Türrahmen und zog sich eine kleinere Kontusionswunde über dem linken Auge zu. Der Patient wurde nicht ohnmächtig, sondern suchte sofort den wachhabenden Arzt des Krankenhauses auf, der die Wunde reinigte und 3 Klemmen einsetzte, wonach er dem Patienten 3 cm³ (3000 Einheiten) Tetanusantitoxin intramuskulär in den linken Schenkel gab. Der Patient hatte vor der Behandlung mitgeteilt, er habe bisher nie Serum irgendwelcher Art erhalten und nie Symptome von Überempfindlichkeit gehabt; er zeigte bei der Untersuchung keine Zeichen von *Commotio cerebri*. Die folgenden Tage war er gesund und lebhaft wie gewöhnlich und verrichtete seine Arbeit. Am 4. Tag nach dem Trauma bekam er Ödem um die Augen, am 5. Tag hatten sich die Ödeme auf die Wangen ausgedehnt, am 6. Tag bekam er starkes Hautjucken und in der Nacht heftiges Erbrechen; am 7. Tag morgens wurde derselbe Arzt herbeigerufen, der ihn im Krankenhaus behandelt hatte. Der Arzt fand ihn zu diesem Zeitpunkt etwas unklar, er konnte z. B. den Arzt nicht erkennen. Er machte jedoch keinen febrilen Eindruck und war nicht besonders angegriffen. Als sich der Arzt dann entfernt hatte, um seine Einlieferung ins Krankenhaus zu veranlassen, sah die Familie plötzlich das Gesicht des Patienten blau werden; er griff sich nach der Brust und fiel leblos ins Bett zurück. Man rief sofort den Arzt herbei, der einen Augenblick später zurückkehrte und feststellte, dass der Tod eingetreten war.

Obduktionsbefunde:

Die Leiche ist die eines jüngeren Mannes, mittelmässig ernährt und mittelkräftig. Über dem linken Auge findet sich eine 2 cm lange

Kontusionswunde, mit drei Klemmen zusammengehalten. Die linke Hälfte der Wunde ist zusammengewachsen, mit Schorf bedeckt; in der linken Hälfte ist eine kleine Öffnung, aus der man etwas weisslichen Eiter drücken kann. Bei Mikroskopie und Züchtung werden Staphylokokken im Eiter nachgewiesen. Es gibt keine Reaktionen um die Injektionsstelle im linken Schenkel. Die erwähnte Wunde in der Stirn reicht nicht bis auf den Knochen, und es gibt keine Fissur oder Fraktur in der Theca cranii. Dura mater ist natürlich. Die Leptomeningen sind hyperämisch, klar und durchsichtig. Das Hirngewebe ist im Schnitt feucht und hyperämisch, und es findet sich reichliche Flüssigkeit in den Hirnventrikeln. An einzelnen Stellen im Hirngewebe hat man den Eindruck von kleineren Blutungen um die Gefässe. Man sieht keine Blutung im Boden des 4. Ventrikels. Keine Fraktur oder Fissur in der Basis cranii.

Die Lungen sind gross und schwer, etwas emphysematös längs der Vorderflächen. Die Schnittfläche ist blutig, die Gewebezeichnung natürlich.

Das Herz ist von natürlicher Grösse und Form; Gewicht 330 g., Breite 12 cm, Länge 10 cm. Man sieht ein paar kleinere Sehnenflecken auf der Vorderfläche des Herzens; das Herz ist schlaff und enthält grosse Koagel. Atrien, Ventrikel und Klappen natürlich.

Die Ostien der Coronararterien sind nicht verengt. Es finden sich einzelne, sehr kleine gelbliche Intimaverdickungen in den Wänden der Coronararterien zerstreut, aber keine Verengung der Lumina der Gefässe. Die Herzmuskulatur ist natürlich.

Die Leber ist von natürlicher Grösse, die Oberfläche glatt, der Rand ein wenig stumpf, die Farbe ist bläulich-braun, die Schnittfläche trieft von Blut, die Gewebezeichnung ist natürlich.

Die Milz zeigt akute Stase, ist aber im übrigen natürlich.

Die Nieren zeigen ebenfalls akute Stase, im übrigen aber natürliche Verhältnisse.

Mikroskopische Untersuchung:

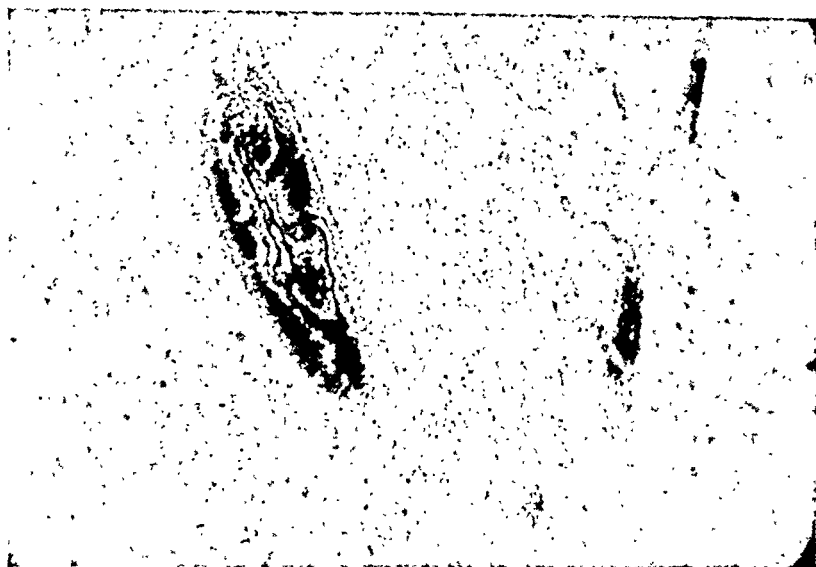
Cortex cerebri: Keine akute oder chronische Entzündung der Leptomeningen. Die Gefässe in den Häuten sind moderat ausgedehnt. Unter den Häuten etwas Ödem. Im Hirngewebe findet sich bedeutendes perivaskuläres Ödem, aber keine perivaskuläre Zellanhäufung. An einzelnen Stellen sieht man ein wenig perivaskuläres Blutaustreten.

Zentralganglien: Perivaskuläres Ödem und an einzelnen Stellen perivaskuläre Blutung.

Cerebellum: Ödem und einige perivaskuläre Blutungen.

Pons und Medulla oblongata: Viele grosse perivaskuläre Blutungen.

Das Herz: Die Gefässe sind mässig blutgefüllt. Hier und da findet sich eine Blutung zwischen den Muskelfasern. In Schnitten von der Vorderseite des linken Ventrikels sieht man eine kleine frische Myofibrose mit zahlreichen Fibroblasten.



Mikrophotografie einer perivaskularen Gehirnblutung.

Die Leber: Ausgesprochenes Ödem und erhebliche Stase. Es gibt keine Änderungen in den portabiliären Räumen, keine Zeichen der Entzündung.

Die Nieren: Ganz einzelne fibröse Striche nahe an der Oberfläche, stellenweise ein wenig Exsudat in den Kapselräumen. Die Tubuli contorti natürlich. Die Gefässe sind stark ausgedehnt, und es finden sich kleine Blutungen sowohl in der Rinde als im Mark.

Die Lungen: Die Alveolen eigentlich ausgedehnt. Die Kapillaren in den Lungensepta strotzend voll von Blut. Man sieht kein Ödem und keine Zeichen von Entzündung. Keine Herzfehlerzellen.

Die Milz: Einige Blutüberfüllung, sonst nichts Besonderes.

Schnitte aus dem Gewebe um die Wunde über dem linken Auge zeigen: eine einfache, überwiegend subacute, mässig verbreitete Entzündung.

Die Obduktion hat somit keine sicheren Auskünfte über die Todesursache gegeben; speziell hat man keine Zeichen von Meningitis nach dem Trauma, von Morbus cordis oder Veneficium gefunden. Indessen sprechen die Organänderungen in Verbindung mit den klinischen Auskünften dafür, dass der Tod von einer anaphylaktischen Reaktion herrührt — verursacht von der prophylaktischen Tetanusantitoxin-Injektion. Die kapillare Hyperämie in den Organen und die kleinen Blutungen nach dem Gewebe hin zeigen, dass die anaphylaktische Reaktion anscheinend ausschliesslich eine Funktionsstörung in den Kapillaren mit Tonusherabsetzung und vergrösserter Permeabilität verursacht hat, und der Tod müsste dann also von einer peripheren Gefässinsuffizienz verursacht worden sein. Nach den sparsamen klinischen Auskünften sind indessen noch ungefähr eine Viertelstunde vor dem Eintritt des Todes keine Insuffizienzsymptome schwereren Grades nachgewiesen worden. Dies schliesst ja nicht aus, dass diese sich plötzlich und so gewaltsam haben entwickeln können, dass der Tod in wenigen Minuten eingetreten ist, was man jedenfalls bei Schock in unmittelbarem Anschluss an die Injektion beobachtet hat.

Bei den von *Schüttelhelm* referierten Fällen von Spätschock hat man dagegen Shocksymptome mit Blutdruckfall und kleinem, frequentem Puls längere Zeit hindurch beobachtet.

Man hat indessen bei der Obduktion — wahrscheinlich in Verbindung mit der Kapillarbeschädigung — perivasculäres Ödem und perivasculäre Blutungen überall im Gehirn nachgewiesen, und zwar am deutlichsten in Pons und in der Medulla oblongata. Die Zirkulationsstörung, welche diese Blutungen verursacht haben müssen, kann vielleicht die zuletzt beobachteten Symptome erklären: die Unklarheit und das wiederholte Erbrechen, ebenso wie die Blutungen durch die hervorgerufene Zirkulationsstörung in den lebenswichtigen Zentren in der Medulla oblongata den Eintritt des Todes haben verursachen können, oder wenigstens ein wesentlich mitwirkender Faktor gewesen sein können. Möglicherweise kann

dies erklären, dass die shockartigen Symptome keine Zeit gehabt haben, so deutlich zu werden.

Die Bedeutung perivascularer Gehirnblutungen als Todesursache ist in den späteren Jahren von *Berner* stark betont worden; *Berner* hat diese Blutungen besonders im Zusammenhang mit Traumen — in Relation zu den bekannten Arbeiten von *Duret* studiert. *Berner* weist perivascular Blutungen makroskopisch in 60 % und mikroskopisch in 100 % bei Todesfällen nach Kopftraumen nach, und die Prädilektionsstelle der Blutungen ist der Boden des 4. Ventrikels vor *Striae acusticae* dicht am *Sulcus medianus*.

Berner hat indessen auch zerstreute perivascular Gehirnblutungen beobachtet, am zahlreichsten jedoch in der *Medulla oblongata* bei so verschiedenen Zuständen wie Kohlenoxydvergiftung, Methylalkoholvergiftung, Polymyelitis und Herzinfarkt. *Berner* hält diese Blutungen für *Diapedesisblutungen*, und der Umstand, dass die Blutungen aus so verschiedenen Ursachen auftreten, ist, meint er, ein Ausdruck dafür, dass die Gefäße speziell in der *Medulla oblongata* für Irritanten von sowohl traumatischer als toxischer Art besonders empfindlich sind; und die Zirkulationsstörung, welche die Blutungen in den lebenswichtigen Zentren hervorrufen, hält er für die Todesursache.

Die Bedeutung dieser sogenannten *Duret-Berner'schen* Blutungen als Todesursache, besonders bei Kopftraumen, ist in den letzten Jahren erörtert worden. Diese Erörterung fällt ausserhalb des Rahmens dieses Artikels, aber es muss erwähnt werden, dass *Harbitz* meint, diese Blutungen haben keine Bedeutung als Todesursache, und dass *Dahl* und *Elo* angeben, in einem zufälligen Material in mehreren Fällen Blutungen im Boden des 4. Ventrikels beobachtet zu haben, und sie weisen nach, dass diese Blutungen perivenöse, subependymäre Rhexisblutungen sind, die wahrscheinlich agonal entstanden sind.

Résumé:

Nach Erwähnung der in der Literatur beschriebenen, tödlich verlaufenden Shocks nach Seruminjektion und deren Ähnlichkeitspunkte, sowohl klinisch als pathologisch-anatomisch mit dem anaphylaktischen Shock bei Tieren, und nach einer kurzen Erwähnung des Symptomkomplexes, der Serumkrankheit, wird ein tödlich verlaufender Serumfall nach prophylaktischer Tetanusantitoxin-Injektion bei einem 42-jährigen, früher gesunden Mann berichtet, der weder je Symptome von Überempfindlichkeit aufgewiesen, noch früher Seruminjektion erhalten hat.

Bei der Obduktion wurden kapillare Hyperämie in den Organen, perivaskuläres Ödem und perivaskuläre Blutungen überall im Gehirn, besonders in der Medulla oblongata und Pons, kleine Blutungen in den Nieren und kleinere Blutaustritte in der Herzmuskulatur nachgewiesen. Da man eine Viertelstunde vor dem Eintritt des Todes klinisch noch keine deutlichen schockartigen Symptome beobachtet hat, hat man die Möglichkeit hervorgehoben, dass die nachgewiesenen perivaskulären Hirnblutungen eine wesentliche Ursache zum Eintritt des Todes gewesen sind.

LITERATUR.

- Andersen, W. Thune: U. L. L. 100, 966, 1938.
 Berner, O.: Eine gerichtliche Übersicht über den Entwicklungsstadium im Stadium der traumatischen Gehirnläsion mit besonderem Hinblick auf den Begriff commotio cerebri. - Oslo 1935.
 Boughton, T. H.: Journ. Amer. Med. Ass. 73, 1912, 1919.
 Bullowa, J. G. M.: The Management of the Pneumonia. New York 1937.
 Bullowa & Jacobi, M.: Arch. int. Med. 36, 306, 1930.
 Dahl, B.: Norsk Mag. f. Lægevidenskapen. 137, 1937.
 Dean, H. R.: Journ. of Path. and Bact. 25, 305, 1932.
 Doerr, H.: Allergie und Anaphylaxie. - Handb. d. pathog. Mikroorganismen. W. Kollé, K. Kraus & P. Uhlenhuth. 1929.
 Elo, O.: Acta soc. med. Fennicae & Duodecimae 30, 60, 1919.
 Fawcett, J. & Ryle, J.: The Lancet, 201, 395, 1923.

- Fournet, M.*: Annales de Med. leg. 18, 667. 1938.
- Harbitz, F.*: Norsk Mag. f. Lægevidenskapen. 501. 1931.
— Nordisk Med. Tidsskrift. 7. 289. 1934.
- Hardouin, P.*: Bull. soc. nat. chir. 59. 1933. cit. Deutsch. Zschr. f. d. ges. ger. Med. 23. 143. 1934.
- Heckscher, H.*: Acta medica scand. 63. 522. 1926.
— ibid. 64. 497. 1926.
- Lamson, R. W.*: Journ. of Amer. med. Ass. 82. 1096. 1924.
- Madsen, Borck, P.*: U. f. L. 101. 940. 1939.
- Mazel & Guilleminet*: Annales de med. leg. 49. 677. 1939.
- Moon, V. H.*: Shock and related Capillary Phenomena. London 1938.
- Nissen, N. I.*: U. f. L. 100. 955. 1938.
- Schaer, H.*: Schweizerische med. Wschr. 64. 791. 1934.
- Schnitzelhelm, A.*: Handb. d. inn. Med. 2. udg. 1. 1925.
- Scholz, G.*: Med. Klinik. 48. 1585. 1922.
- Ustvedt, Y.*: Norsk Mag. f. Lægevidenskapen. 81. 625. 1920.

(AUS DER KOPENHAGENER UNIVERSITÄTSKLINIK FÜR
OHREN-, NASEN- UND HALSLEIDEN, CHEF: PROFESSOR, DR.
A. THORNVAL, UND DEM PATOLOGISCH-ANATOMISCHEN
INSTITUT DER UNIVERSITÄT, CHEF: PROFESSOR,
DR. J. ENGELBRETH-HOLM.)

PERIARTERITIS NODOSA DER PULMONAL- ARTERIE UND PRIMÄRE PULMONAL- SKLEROSE.

Von *Viggo Eskelund*.

(Eingegangen bei der Redaktion am 21. April 1911).

Die Krankheiten des Gefässsystemes repräsentieren ein Gebiet der Pathologie, welches sowohl in Bezug auf die Terminologie, als auf die Deutung der pathologisch-anatomischen Veränderungen von besonderer Unklarheit und Verschiedenartigkeit geprägt ist. Diese Tatsache beruht wohl grösstenteils darauf, dass die ätiologischen Faktoren in vielen Fällen unbekannt sind und die festgestellten Veränderungen nicht selten ein Einzelglied einer Entwicklungsreihe, deren übrige Stufen man nur vermuten kann, darstellen.

Zusätzlich sei in dieser Verbindung angeführt, dass einige der Gefässleiden sehr selten sind und in der Regel nur indirekt durch ihren Einfluss auf die Funktionen verschiedener Organe die Aufmerksamkeit des Klinikers und Pathologen erregen. Fälle dieser Art werden in der Regel in kasuistischer Form mit mehr oder weniger erschöpfenden Angaben veröffentlicht und man ist darauf angewiesen, sich allmählich auf Grund dieser Veröffentlichungen das klinische Bild, die pathologische Anatomie und evtl. die Ätiologie eines bestimmten Gefässleidens aufzubauen. Im Sinne dieser Bestrebungen möchte ich anschliessend einen Fall von Entzündungsveränderungen in der Arteria pulmonalis, der am Pathologisch-anatomischen In-

stitut der Universität Kopenhagen (RH. Abt. F. Journal 9425/34) zur Sektion kam, referieren.

Der Patient, ein 11-jähriger Knabe, war am Lande geboren und angeblich in den ersten Lebensjahren — wenn man von einer linksseitigen Ohreiterung absieht — gesund gewesen. Dieses Symptom nahm schon im Säuglingsalter seinen Anfang. Im Mai 1934 wurde er — 7 Jahre alt — in die Universitätsohrenklinik eingebracht. Diagnose: Otitis media suppurativa chronica. Cholesteatoma sinistra. Otitis med. perf. dext. seqv., Pseudofistel-Symptome. Pat. wurde nach erfolgter Behandlung gebessert entlassen, im darauffolgenden Jahre aber wieder — auch diesmal wegen Ohrenleiden und Influenza — aufgenommen. Aus dem Journale geht hervor, dass Pat. — vom Ohrenleiden abgesehen, nach der Entlassung gesund gewesen war. Es war jedoch eine Adenotomie vorgenommen worden. Das Ohrenleiden kam besonders durch Eiterung aus dem rechten Ohre zum Ausdruck. Zeitweise Schmerzen in der Stirngegend. Schwindelgefühl bestand nicht. Keine besondere Neigung zu Erkältungen. Wurde nach 3 Monaten entlassen und fühlte sich in den darauffolgenden 3 Jahren gesund.

Im April 1938 wurde er wieder hospitalisiert. Wieder dauernder Fluss aus dem rechten Ohr. Die Funktionen wurden im übrigen als normal angegeben. Bei der Aufnahme wurde angeführt, dass sein Aussehen gesund sei. An den Seiten des Halses leichte Schwellung kleiner Lymphdrüsen. Die Stetoskopie des Herzens und der Lunge o. B. Die Untersuchung des Abdomen und der Reflexe ebenfalls o. B. Unter anderen Untersuchungen sei angeführt, dass die WaR. negativ, der Hämoglobinprozent 90 und die Pirquet-Reaktionen nach 24 und 48 Stunden negativ waren. Im Harn kein Eiweiss.

Ca. 6 Wochen nach der Aufnahme erkrankte er an einem akuten katarrhalischen Leiden. Am 27./5. wurde im Journal vermerkt, dass er im Laufe der Nacht ziemlich gehustet und über Hals- und Kopfschmerzen geklagt hatte. Die Mandeln waren etwas rot und geschwollen, jedoch ohne Belag. Die Stetoskopie der Lungen o. B. Am folgenden Tage follikulärer Belag beider Gaumenmandeln. In den folgenden Tagen etwas schwankende Symptome. Der Pat. hustete ein wenig und war besonders an den Lippen leicht cyanotisch, befand sich aber im Übrigen wohl. Die Stetoskopie des Herzens ergab keinen abnormen Befund und im Harn konnte weder Albumen noch Blut nachgewiesen werden. Am 11./6. wird vermerkt, dass er im Laufe des letzten Tages gehustet hätte und einmal Schleim expectoriert hätte. Bei der Stetoskopie noch immer keine abnormen Befunde. Am 12./6. klagte er über Durst. Der Appetit war schlecht. Der Husten war stärker geworden und Pat. schlief unruhig. Des

Morgens erbrach er sich einmal. Er lag ganz still dahin und zeigte ausgesprochene Cyanose der Wangen und Lippen. Leichtes Spielen der Nasenflügel. Der Puls regelmässig. Die Herzstetoskopie zeigte die Grenzen bei C IV, linker Sternalrand. Der Iktus in der Medio-clavicularlinie. Über dem Präcordium ein deutliches prästolisches Geräusch. In den Lungen wurden keine Dämpfungen und keine Nebengeräusche festgestellt. Kein Eiweiss im Urin. Am 13./6. wurde in leichter Äthernarkose die Resektion des rechten Processus mastoideus vorgenommen. Die Operation verlief ohne Komplikationen. Bei der erneuten Herzuntersuchung wurden die Grenzen wie vordem festgestellt. Am linken Sternalrand wurde ein ausgesprochenes prästolisches Geräusch vernommen. P II war akzentuiert. Die Lungenstetoskopie ergab keine abnormen Befunde. Die darauffolgenden Tage zeigten den Pat. sehr müde und entkräftet. Es bestand ein ziemlich heftiger, trockener Husten. Die elektrocardiographische Untersuchung ergab starkes Übergewicht der rechten Seite. P 2 und P 3 waren erhöht. S-T II und S-T III samt T III waren negativ. Die Veränderungen wurden in die Richtung einer Mitralstenose mit organischen myocardischen Veränderungen gedeutet. Der Pat. wurde allmählich müder und hinfällig. Er duselte dahin und nahm fast nichts zu sich. Es bestand ziemlich ausgesprochene Cyanose von etwas wechselnder Intensität. Der Puls war weich, schnell und regelmässig. Das Gesicht kongestioniert. Am 26./6. wurde über der linken regio infrascapularis Lungenrasseln festgestellt. Am folgenden Tage konnte etwas Eiweiss im Harn nachgewiesen werden. Die Cyanose nahm an Intensität zu, wenngleich sie sich immer noch etwas wechselnd darbot. Die Albuminurie hielt an und am 30./6. schwitzte der Patient plötzlich sehr stark, wurde ausgesprochen cyanotisch und kurzatmig, worauf der Tod im Laufe von ca. 5 Minuten eintrat.

Bei der am darauffolgenden Tage stattgefundenen *Autopsie* fand man ein Körpergewicht von 28 kg. Die Länge der Leiche war 139 cm. Der Ernährungszustand unter mittel. Hinter dem rechten Ohre eine Operationswunde. Die Organe der Mundhöhle nicht untersucht. In der Luftröhre, deren Schleimhaut ziemlich gerötet erschien, schleimig, fahle Flüssigkeit. Die Pleura glatt, spiegelnd und durchsichtig. Kein Exsudat in den Pleurahöhlen, keine Verwachsungen. Die Lungen waren gross, schwer, von verhältnismässig zäher Konsistenz. Die Schnittfläche dunkelrot und sehr feucht. Sowohl die Bronchienverzweigungen, als die Gefässzeichnung machte sich deutlicher bemerkbar als gewöhnlich. Besonders dominierten die Verästelungen der Pulmonalarterie; die Gefässe hoben sich über die Oberfläche als weissliche, dicke, feste Vorsprünge vor. Das Lungenparenchym selbst war ziemlich fest, von gleichmässiger Konsistenz.

samt überall lufthältig. Die Oberfläche der Lunge leicht höckerig, schwach marmoriert. Anzeichen von Tuberkulose wurden nicht festgestellt. Die Bronchial- und Hilus-Lymphdrüsen leicht geschwollen. Verkäsungen oder verkalkte Gebiete wurden nicht gefunden. Das Perikardium war glatt und spiegelnd; normale Flüssigkeitsmengen. Das Herz zeigte ausgesprochene Veränderungen. Der rechte Vorhof war fast bis zu Hühnereigrösse erweitert, mit geronnenem Blut angefüllt. Im rechten Aurikel keine Thromben. Die rechte Herzkammer zeigte sehr ausgesprochene Hypertrophie. Die Wand war ca. 6 mm dick, die Columnae steif, verdickt, prominierend. Die muskuläre Hypertrophie setzte sich nach dem Conus zu fort. Auf der rechten Seite wurden keine Klappenabnormitäten festgestellt. Keine Stenose des Pulmonalostium. Das Foramen ovale geschlossen. Der Hauptstamm der Arteria pulmonalis war erweitert, zeigte knapp über den Klappen Wandverdickung und einen Umfang von $8\frac{1}{2}$ cm. Über das Genannte hinaus wurden in der Gefässwand makroskopisch keine Veränderungen festgestellt. Das Aussehen des Gefässes ist am besten mit dem der Aorta zu vergleichen. Die Pulmonalarterie wurde in ihren Verzweigungen eröffnet. Es wurden hierbei ausser mässiger Erweiterung der verhältnismässig dickwandigen Gefässe keine Veränderungen festgestellt. Die linke Herzhälfte zeigte in Bezug auf Klappen und Ostien keine Abnormitäten. Die Wand der linken Herzkammer war nur 6 mm dick; die Columnae dünn, eher etwas atrophisch. Keine Anzeichen von Endocarditis. Die Vena pulmonalis ohne Verengung. Die Coronararterien vollständig normal; speziell wurden keine nodulären Prozesse festgestellt. Das Gewicht des Herzens 253 g. Die Aorta war schmaler als die Pulmonalis und hatte einen Umfang von $5\frac{1}{2}$ cm. Ihre Wand war dünner als die der Pulmonalis und das Gefäss erschien im Ganzen eher etwas atrophisch.

Die Leber $20 \times 17 \times 5\frac{1}{2}$ cm. Es wurden die üblichen Zeichen einer akuten Stauung festgestellt. Das Organ zeigte im Übrigen keine abnormen Befunde. Die Milz $10\frac{1}{2} \times 5 \times 3$ cm. Sie war ziemlich steif, abgerundet. Die Schnittfläche dunkel. Die Konsistenz fest. Die Nieren $9\frac{1}{2} \times 5 \times 3\frac{1}{2}$ cm. Die Kapsel löste sich leicht ab, die Oberfläche glatt mit bewahrter fötaler Lappenfurchung. Auf der Schnitt- und Oberfläche geringe Stauungszeichnung. Keine Schrumpfung. Keine Infarkte. Das Gehirn zeigte keine Anzeichen von Entzündung der Hirnhäute. Die Gefässe normal, keine Sinusthrombose. Die Untersuchung der Ohren ergab rechtsseitig chronische Entzündungsveränderungen, jedoch ohne Eiter. Die makroskopische Untersuchung der übrigen Organe ergab nichts von Interesse.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Arteria pulmonalis

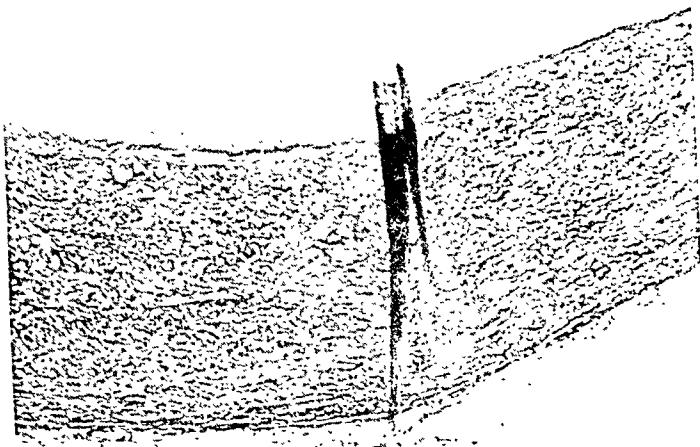


Fig. 1.

Schnitt durch den Hauptstamm der Arteria pulmonalis (42 \times).

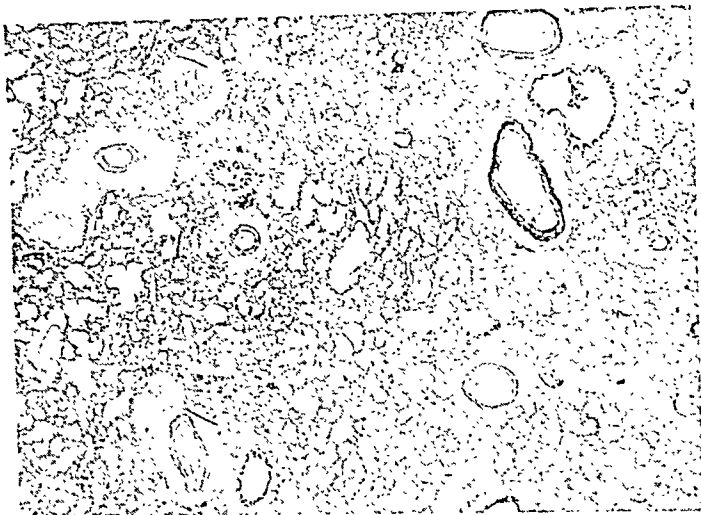


Fig. 2.

Übersicht (10 \times).

zeigte sich die Wand des *Hauptstammes* sehr verschieden verdickt. Die äusseren Grenzen betrugen 0.7—1.6 mm. Stellenweise war die Intima vollständig normal, während man wieder an anderen Stellen eine durch lockere, zellarme Bindegewebswucherung bedingte moderate Verdickung beobachten konnte. Zentral in der Verdickung waren nur vereinzelte kollagene Fibrillen ersichtlich, während man in den tieferen Schichten bedeutend mehr Fibrillen feststellen konnte, die schichtenweise angeordnet waren. Auch die elastischen Fibrillen waren besonders in den tiefsten Intimaschichten vermehrt. Ausserdem wurde verstreut sehr sparsame Lymphozyteninfiltration, die stellenweise ihren Sitz in den oberen Schichten hatte, beobachtet; es wurden jedoch keine degenerativen Veränderungen und keine Kalkablagerungen festgestellt. Die Media zeigte ausgedehntere Variationen; und es waren eben diese Mediavariationen, die die wechselnde Verdickung der ganzen Wand bedingten. Es bestand keine bestimmte Proportion zwischen den Intimaverdickungen und der Mediaverdickung. Die elastischen Fibrillen verliefen stellenweise regelmässig und die Bilder zeigten hier grosse Ähnlichkeit mit Aortaschnitten; an anderen Stellen war ihr Verlauf jedoch unregelmässig, die Fibrillen zeigten sich ungleichmässig verteilt und boten sich mit abwechselnd groben und feinen Fasern dar, die von kollagenen Fibrillenbündeln in variierender Menge getrennt waren. Die grössten Bindegewebsmengen werden den Intimaverdickungen entsprechend, in der Media vorgefunden und das Bindegewebe dominiert hier besonders die zentralen Mediagebiete. Keine degenerativen oder nekrotischen Mediaveränderungen. Keine Anzeichen von Entzündung.

Die Adventitia schmal. Um kleine adventitielle Gefässe herum spärliche Infiltration von Lymphozyten. Die Gefässe waren jedoch im Übrigen normal und zeigten speziell keine Anzeichen von Obliteration. Ausserhalb der Adventitia wurden auch im subperikardialen Gewebe leichte Entzündungserscheinungen beobachtet.

Schnitte durch den *Hauptast* liessen Veränderungen der gleichen Art, wie die oben genannten, erkennen; moderate, lokale Intimaverdickung, Neubildung von elastischen Fasern und besonders in den tieferen Schichten der Intima Bindegewebsvermehrung.

In den *mittelgrossen Verästelungen* bis zu einem Durchmesser von ca. 2 mm wurden über leicht lymphozytinfiltrierte Intimaverdickungen hinaus keine sicheren pathologischen Veränderungen festgestellt. In der Adventitia keine Entzündungserscheinungen. Die feineren Verzweigungen zeigten sehr schwere pathologische Veränderungen. Man beobachtete Gefässe, deren Adventitia zu einer mächtigen Hülle von kollagenem Bindegewebe umgebildet war, in der die Fibrillen einigermassen parallel und konzentrisch verliefen

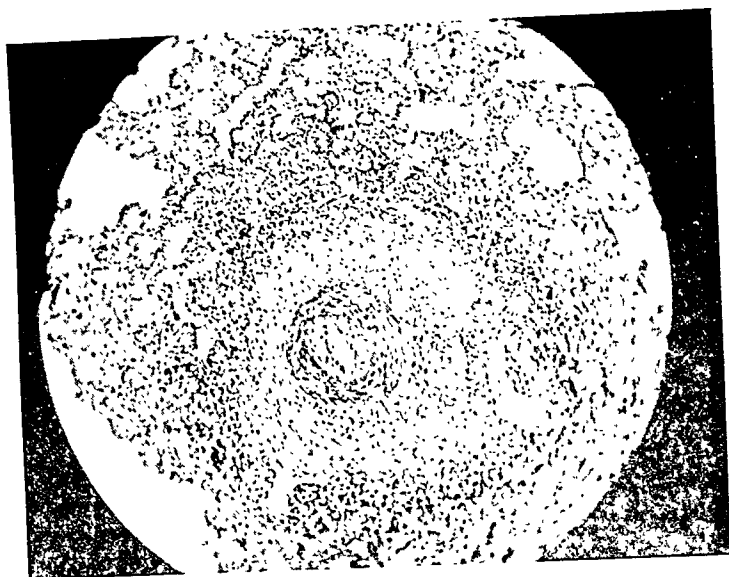


Fig. 3.

Arterie mit starker Adventitiaverdickung und Lymphozyteninfiltration (70 \times).



Fig. 4.

Arterie mit knotenförmiger Adventitiaverdickung (33 \times).

(Fig. 3). Die Verdickung wechselte und am Aussenrand der Adventitia wurde ein dunkler Saum beobachtet, der einer dichten Anhäufung von Lymphozyten, zwischen denen einige Plasmazellen ersichtlich waren, entsprach. Die Lymphozyteninfiltration erstreckte sich bis zu einem gewissen Grade in das umgebende Gewebe hinein. Wie genannt, zeigte die fibröse Verdickung der Adventitia eine wechselnde Breite und an mehreren Stellen bot sich das Bindegewebe knotig verdickt dar. In einem Schnitt war ein solcher Bindegewebsknoten in der Adventitia eines Gefässes feststellbar, welches darüber hinaus in Bezug auf die Intima und Media keine sicheren pathologischen Veränderungen zeigte (Fig. 4). Das Bindegewebe enthielt in den Adventitiaverdickungen — wie schon erwähnt — zahlreiche kollagene Fibrillen. Es konnten jedoch auch Gebiete beobachtet werden, in denen die Zellkerne grösser und runder und die Fibrillen spärlicher waren, so dass das ganze Gewebe einen jüngeren Eindruck machte. Ausserdem wurden zahlreiche Kapillaren beobachtet und stellenweise konnte spärliche, andererseits wieder reichliche Infiltration von Lymphozyten und Plasmazellen festgestellt werden. Stellenweise enthielt das Gewebe auch Blutpigment.

Wie erwähnt, bestand der breite Wall an der äusseren Grenze der Adventitia überwiegend aus Lymphozyten und Plasmazellen, die ein Gewebe, welches aus Fibroblasten und verdichtetem Lungengewebe bestand, infiltrierten. In dieser Randzone konnten auch zahlreiche Phagozyten, etwas Kohlenpigment, degenerativ veränderte Zellformen und Blutpigment festgestellt werden. Keine grösseren Blutungen. Die Infiltration erstreckte sich, wie erwähnt, etwas in die Umgebung hinaus und dort, wo ein Bronchienast in unmittelbarer Nähe der Arterie lag, konnte auch um diesen herum moderate Lymphozyteninfiltration festgestellt werden.

Die Mediabefunde wechselten: es waren Arterienäste ersichtlich, deren Media sich, selbst wenn die Adventitia fibrös verdickt war, normal darbot. Andererseits fand man auch Äste, deren Media stellenweise nekrotisiert war, sich mit ganz verwischten oder nur schwach schattenhaft gezeichneten Fibrillen präsentierte, so dass die ganze Mediaschicht zu Zell- und Kerntrümmern verschiedener Grösse umgebildet war. In einigen Gefässen konnten diese nekrotischen Veränderungen bei verdünnter Media beobachtet werden, ohne dass das Bindegewebe der Adventitia vermehrt war. Der nekrotische Herd war in diesem Falle sowohl nach innen als nach aussen von Lymphozyten umgeben (Fig. 5). In anderen Fällen — namentlich in denen, in welchen die adventitiellen Verdickungen weniger massig und von Fibroblasten aufgebaut waren — schien der Nekrosenherd die ganze Gefässwand miteinzubeziehen, so dass das Zentrum annähernd in der Übergangszone zwischen Media und



Fig. 5.
Arterie mit Medianekrose (120 \times).

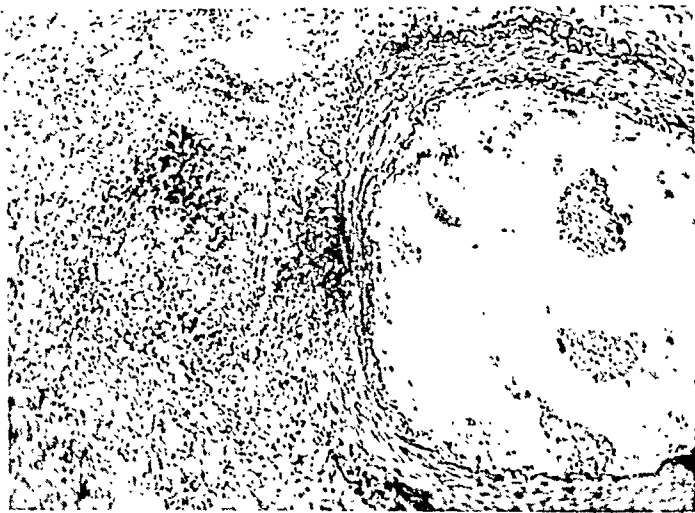


Fig. 6.
Arterie mit nekrotischen Veränderungen der Media und Adventitia (100 \times).

Adventitia zu liegen kam (Fig. 6). Selbst in den im höchsten Grad nekrotisierten Gebieten fand man keine polymorphkernigen Leukozyten. Desweiteren wurden in einigen Schnitten den Nekrosen entsprechend bis zu kleinen Aneurysmen ansteigende Erweiterungen der Wand beobachtet (Fig. 7 und 8). Nirgends grössere Aneurysmen, keine Thrombenmassen, keine grösseren Gewebsblutungen. Die Intima war an den meisten Stellen jedenfalls in den kleineren Gefässen stark verdickt, wenngleich man auch alle Übergänge von in der Regel relativ grossen Gefässen mit deutlichen pathologischen Prozessen in der Adventitia und fast ohne Intimareaktion, bis zu ganz kleinen Gefässen, die sich alle stark verengt oder vollständig obliteriert darboten, (Fig. 9), beobachten konnte. Das Gewebe der Intima war in einigen Fällen vollständig organisiert; in anderen Fällen wurden Ödem und diffuse, aber ziemlich spärliche Infiltration von Lymphozyten und Plasmazellen beobachtet. In den Fällen, in denen die Obliteration unvollständig war, befand sich die Lichtung in der Regel im Zentrum des Gefässes oder in der unmittelbaren Nähe des Zentrum. Es scheint sich somit jedenfalls nicht um eine Trombosierung mit sekundärer Kanalisierung zu handeln. In einzelnen Gefässen konnten in der Intima fibrinähnliche Niederschläge festgestellt werden.

Das Lungengewebe bot sich grob gezeichnet dar. Die interalveolären Septa waren ziemlich breit, die Kapillaren blutgefüllt. Der obliterierende Prozess scheint sich somit nicht in das Kapillargebiet hinaus erstreckt zu haben. Das Lungengewebe zeigte stellenweise emphysematöse Zeichnung und namentlich in den breitesten Septa ausserdem spärliche Lymphozyteninfiltration. Ausgesprochene Fibrose wurde nicht gefunden. Grössere luftleere Gebiete wurden nicht beobachtet. In vielen Alveolen Ödem und desquamierte Alveolarepithelien, jedoch keine Herzfehlerzellen. Um die feinsten Alveolenverzweigungen herum mässige Leukozyteninfiltration, die jedoch schwächer als die perivaskuläre Infiltration war. Das Epithel der Bronchien zeigte sich fast überall bewahrt. Im subepithelialen Gewebe verhältnismässig wenig Lymphozyten. Weder in den kleinen, noch in den grossen Bronchien konnte Schleim oder Eiter festgestellt werden. Die Arteria bronchiale und die Venen ohne Befund. Nirgends Veränderungen, die Verdacht auf Tuberkulose aufkommen liessen.

Die mikroskopische Untersuchung des Herzens:

Das Perikardium o. B. Die Fasern des Myokardium waren sehr grob und dick, zeigten jedoch gleichfalls keine krankhaften Veränderungen. Die Coronararterien vollständig *normal*, speziell wur-

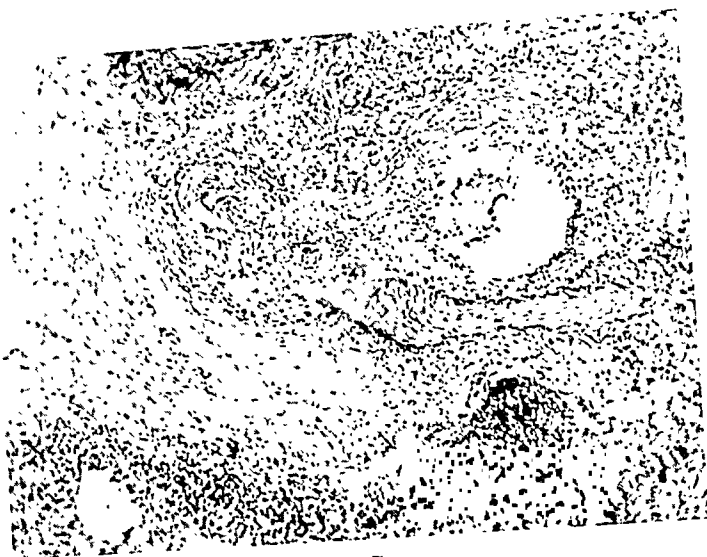


Fig. 7.

Arterie mit beginnender Aneurysmenbildung in Folge von Wandnekrose (100 \times).



Fig. 8.

Arterienast mit einem kleinen Aneurysma (100 \times).

den nirgends Entzündungsveränderungen, Nekrosen oder Infarzierungen gefunden.

Es wurde somit bei der Untersuchung eine Entzündung in den feinen Verzweigungen der Pulmonalarterie festgestellt. Die Entzündung scheint ziemlich lange bestanden zu haben, indem man besonders in der Adventitia ganz reine fibröse Verdickungen nachweisen konnte. Ausserdem wurden jedoch auch akute nekrotische Prozesse, die sich nodulär in der Adventitia und Media lokalisierten, festgestellt. Schliesslich wurden verstreut aneurysmatische Erweiterungen gefunden. Die Intimaverdickungen scheinen jedenfalls in vielen Fällen im Verhältnis zu dem Media- und Adventitiaveränderungen sekundär zu sein. In den Präkapillarenverzweigungen sind die Intimaproliferationen sehr stark verbreitet, während die Intima einiger grösserer Zweige normal oder nur schwach befallen ist. Die entzündlichen Veränderungen, die in den Lufttröhrenverastelungen und im para-arteriellen Lungengewebe festgestellt wurden, sind wohl kaum so ausgesprochen, dass man sie für die Veränderungen des Gefässgebietes verantwortlich machen könnte.

Es wurden somit bei der postmortellen Untersuchung Veränderungen gefunden, die mit den klinischen Befunden und dem Verlauf der Krankheit gut übereinstimmen. Als wesentlichster Sektionsbefund wurde in den feinen Verzweigungen der Arteria pulmonalis ein chronischer obliterierender Entzündungszustand festgestellt und dementsprechend eine Arbeitshypertrophie in der rechten Herzhälfte nachgewiesen. Klinisch kam dies durch mässige Cyanose, Arbeitsdyspnoe, Übergewicht der rechten Seite bei der elektrokardiographischen Untersuchung, samt bei der Stethoskopie durch Akzentuierung des P_{II} und ein präsysistolisches Praecordialgeräusch zum Ausdruck. Ausser den chronischen Veränderungen in der Pulmonalarterie wurden auch akutere nekrotische Prozesse beobachtet, die wohl die wesentlichste Ursache zum Todeseintritt darstellen. Die adventitielle Entzündungsreaktion hatte sich in die Bronchienäste verbreitet und stellt die Ursache des trockenen Hustens, der besonders in den letzten Tagen bestand, dar.

Das klinische Krankheitsbild in Verbindung mit dem makroskopischen Sektionsbefund — speziell dem »Cor pulmonale« — liess am ehesten einen Vergleich mit der verhältnis-



Fig. 9.
Kleiner, vollständig obliterierter Arterienast (120 \times).

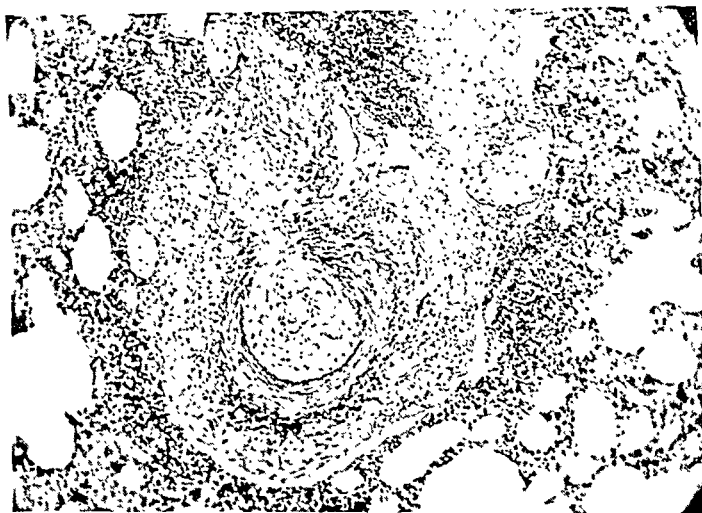


Fig. 10.
Arterienast mit starker Lichtungsverengung (85 \times).

mässig seltenen primären Pulmonalisarteriosklerose und zwar mit nur geringen Veränderungen in den grösseren Ästen, zu. Makroskopisch wurde ein entzündliches Gefässleiden gefunden, welches als Ausdruck verschiedener Krankheiten angesprochen werden könnte. In erster Linie wird man an die Syphilis denken; wie erwähnt, war aber die Wa.R. negativ und es lagen keine Angaben über syphilitische Infektionen bei den Angehörigen des Patienten vor. Im übrigen wurden in den Organen keinerlei Veränderungen gefunden, die als Anzeichen einer kongeniten syphilitischen Affektion gedeutet werden könnten. Auch die Tuberkulose scheint man mit Sicherheit ausschliessen zu können. Makroskopisch wurden in den Lungen und in den Lymphdrüsen keine Anzeichen von Tuberkulose gefunden und die Pirquetreaktion war negativ.

Bei Febris rheumatica hat man Gefässveränderungen von etwas wechselnder Erscheinung gefunden. Klinisch lag in unserem Fall nichts vor, welches in diese Richtung deutete und bei der mikroskopischen Untersuchung des Herzens wurden keine pathologischen Veränderungen nachgewiesen. Die histologischen Bilder der Pulmonalarterienveränderungen an sich deuteten, wie weiter unten erörtert wird, im übrigen auch gar nicht auf eine Febris rheumatica. Eine, im Verhältnis zu der Infektion der Luftwege sekundäre produktive Endarteriitis würde auch ein etwas anderes Bild dargeboten haben. Fast als einzige Möglichkeit bleibt die *Periarteriitis nodosa* zurück. Dieses verhältnismässig seltene Leiden ist eine Entzündung, die besonders die feineren und feinsten Verzweigungen eines oder mehrerer Gefässgebiete befällt. Es wird angeführt, dass sie gewöhnlich mit entzündlicher Infiltration der Adventitia ihren Anfang nimmt. Die Infiltrationen bestehen in den akuten Fällen überwiegend aus polymorphkernigen, eosinophilen oder neutrophilen Leukozyten, samt einigen Lymphozyten und Plasmazellen. Die Zellinfiltration liegt als dichter Ring in den äusseren Gebieten der Adventitia, deren innere Gebiete wesentlich aus einer dichten Schicht Fibroblasten besteht. In der Media und Adventitia entstehen mehr oder weniger lokalisierte degenerative Veränderungen,

die mit Vaskuolisierung oder gar Nekrose von sowohl elastischem Gewebe, als glatter Muskulatur einhergeben. Die Intima ist in einigen Fällen fast unverändert; in anderen Fällen entsteht jedoch eine produktive Reaktion, die sich durch Proliferation des Bindegewebes und Verschluss der Lichtung kenntlich macht. Ab und zu geht der Obliteration eine Thrombosierung mit darauffolgender Organisation voraus. Dies ist das Bild, welches gewöhnlicherweise gefunden wird; es werden jedoch zahlreiche Abweichungen beobachtet. In einigen Fällen herrscht die Medianekrose vor, in anderen Fällen dominieren die adventitiellen Veränderungen, die im allgemeinen als für das Leiden am meisten charakteristisch angesprochen werden. Das Leiden trägt seinen Namen nach den grösseren und kleineren Knoten, die man meistens in der Adventitia findet. Diese Knoten können auf verschiedene Weise entstanden sein. Einige stellen aneurysmatische Erweiterungen dar, die dadurch entstanden sind, dass die nekrotische Media nachgibt. Die Aneurysmen thrombosieren in vielen Fällen, wodurch der Knoten zu einem verhältnismässig festen, fibrösen Bindegewebe umgebildet wird. Das Leiden ist jedoch auch an sich fähig, kleine Knoten, die überwiegend aus Fibroblasten bestehen, zu bilden und diese fokalen Prozesse können in der Media, in der Adventitia und — viel seltener — in der Intima beobachtet werden. Wie erwähnt, befällt das Leiden die feineren und feinsten Gefässzweige, im besonderen die Verzweigungsstellen. In ausgesprochenen Fällen, welche den Gefässen entlang Knotenbildung zeigen, ist es vorwiegend intermittierend in seinem Verlauf; es werden jedoch auch mehrere Fälle mit kontinuierlichem Verlauf beschrieben. Es wird sowohl eine akute Form bei der die Nekrosen und Zellinfiltrate dominieren und eine mehr chronische Form, *Periarteriitis nodosa obsoleta*, bei der die chronischen Entzündungsveränderungen vorherrschen, beschrieben.

In dem oben von mir beschriebenen Fall wurden typische *adventitielle* und *periadventitielle* Veränderungen gefunden. Desweiteren wurden Medianekrosen und an einigen Stellen aneurysmatische Erweiterungen der Lichtung beobachtet. Das

Leiden befällt die Arterioli und die präkapillaren Verästelungen. Die Veränderungen, so wie sie sich histologisch zu erkennen geben, scheinen in einer relativ chronisch verlaufenden Periarteriitis nodosa arteriae pulmonalis mit akuten Exazerbationen zu bestehen. Es drängt sich nun die Frage auf, ob das klinische Bild mit diesem Leiden in Übereinstimmung gebracht werden kann. Als *Kussmaul* im Jahre 1866 und in den darauffolgenden Jahren dieses Leiden beschrieb, war man geneigt, dasselbe als eine relativ akut verlaufende Krankheit mit sicherem letalen Ausgang aufzufassen. In den darauffolgenden Dezennien hat sich das Bild jedoch einigermassen verschoben, indem man Fälle mit chronischerem Verlauf beobachtete, ja es sind sogar einzelne Mitteilungen über vollständig geheilte Fälle veröffentlicht worden. Wenngleich die akut verlaufenden Fälle noch immer in der Mehrzahl sind, ist man jedoch heute der Ansicht, dass das Leiden bedeutend verbreiteter ist, als man früher angenommen hatte und dass es sich in den meisten Fällen der Aufmerksamkeit des Klinikers und auch des Pathologen entzieht.

Die Symptomatologie des Leidens an sich ist ungemein wechselnd und unklar. In den akuten Stadien wird es meistens mit mehr oder weniger ernsten Allgemeinsymptomen eingeleitet und kann in diesem Stadium mit zahlreichen anderen Krankheiten wie Typhus, Trichinose, Sepsis, Poliomyelitis u. a. verwechselt werden. Nach und nach entwickeln sich Lokalsymptome, die durch Ernährungsstörungen der im besonderen Grade vom Leiden befallenen Organe bedingt sind. Unter den Organen, die am häufigsten affiziert sind, können die Niere, das Herz, die Leber und der Verdauungskanal genannt werden. Die Lokalisation in der Arteria pulmonalis ist verhältnismässig selten. Unter 108 Fällen, bei denen es sich obendrein ausschliesslich um akute Fälle handelt, fand *Gruber* (*Zentralblatt für Herz- und Gefässkrankheiten* 18, 145, 1926) nur in 3.7 % eine Affektion der Lunge. In dem hier beschriebenen Fall ist das Leiden vorwiegend chronisch und hat eine gewaltige Hypertrophie der rechten Herzhälfte hervorgerufen. Dadurch erhält das Bild grosse Ähnlichkeit mit dem Leiden,

welches *primäre oder genuine Sklerose der A. pulmonalis* benannt wird.

Dieses Leiden wurde zuerst im Jahre 1865 von Klob beschrieben. Später sind ca. 100 gleichartige Fälle beschrieben, jedoch reduziert eine kritische Durchnahme der Literatur, wie sie z. B. von *Brenner* vorgenommen wurde, die Anzahl auf ca. 25. Eine Ursache zu dieser Unsicherheit in Bezug auf die Abgrenzung des Leidens ist darin zu suchen, dass sich die pathologisch-anatomischen Veränderungen, die dem Leiden zu Grunde liegen, bei näherer Bearbeitung weitgehend verschiedenartig erweisen.

Im Brennpunkt des Leidens liegt ein obliterierender Prozess in den feineren und feinsten Gefässen der Arteria pulmonalis. Dadurch wird der Druck der A. pulmonalis erhöht und die rechte Herzhälfte einer ausgesprochenen Hypertrophie unterzogen. Der veränderte Druck kommt in den meisten Fällen ausserdem noch durch eine ziemlich bedeutende Dilatation und Arteriosklerose im Hauptstamm und den grösseren Ästen der Arteria pulmonalis zum Ausdruck.

Die verschiedenen Referenten sind sich über die eigentliche Natur des pulmonalen Gefässleidens höchst uneinig. In der ersten Zeit erblickte man in den Veränderungen sowohl der gröberen als feineren Gefässverzweigungen den Ausdruck einer gemeinsamen Wirkung einer eigentlichen Arteriosklerose; die Tatsache, dass die Veränderungen oft bei ganz jungen Leuten beobachtet wurden, wollte man als Ausdruck einer besonderen Disposition eventuell einer kongeniten Anlage auslegen. In den jüngsten Jahren ist man geneigt, die arteriosklerotischen Veränderungen der grösseren Gefässe als eine im Verhältnis zum primären Leiden, welches in den feineren Verzweigungen seinen Sitz hat, sekundäre Erscheinung zu betrachten.

Die Veränderungen, die bei der Mikroskopie dieser Arteriolen pulmonales festgestellt wurden, sind — wie oben erwähnt — von wechselnder Art und können in folgende Gruppen gegliedert werden;

- I. Intimaproliferation von mehr oder weniger akutem Gepräge ohne Befallensein der anderen Gefässschichten.
- II. Nekrotische Veränderungen der Media mit geringerer oder stärkerer Intimahyperplasie.
- III. Eine Thrombangitis obliterans vom Bilde des *Bürger-schen Leidens*.

Als vierte Ursache wird — wie oben erwähnt — also auch eine *Periarteriitis nodosa mit chronischem Verlauf* (Kussmaul & Maier) beobachtet.

Die primäre Pulmonalissklerose sollte somit als ein klinisches Syndrom ähnlich dem der *Ayerza'schen Krankheit*, die auch kein pathologisch-anatomisch scharf begrenztes Leiden darstellt, betrachtet werden.

Zusammenfassung.

Ein 11-jähriger Knabe, der 4 Jahre hindurch an Mittelohrenentzündung gelitten hatte, wurde wegen dauernder Eiterung des rechten Ohres in der Universitätsohrenklinik in Kopenhagen aufgenommen, wo die Resektion des Warzenfortsatzes ausgeführt wurde.

Vom Ohrenleiden abgesehen, war er bei der Aufnahme gesund und hatte früher ausser Influenza keine Krankheiten durchgemacht.

6 Wochen nach der Aufnahme und vor der Operation wurde er von einem akuten katarrhalischen Leiden, welches mit Husten, Fieber und follikulärem Belag der Gaumenmandeln einherging, befallen. Ausserdem bestand leichte Cyanose des Antlitzes. Da die Symptome nach wenigen Tagen abgeklungen waren, nahm man in leichter Äthernarkose die oben erwähnte Operation vor.

Im Laufe der 2 darauffolgenden Wochen erschlaffte der Pat. allmählich, wurde matt und cyanotisch und starb plötzlich in tiefer Cyanose.

Die Autopsie zeigte starke Hypertrophie der rechten Herzhälfte, Erweiterung des Hauptstammes der Pulmonalarterie

und Sklerose der auf der Schnittfläche hervortretenden feineren Verzweigungen derselben.

Der Sektionsbefund deutete am ehesten auf eine primäre Sklerose der Pulmonalarterie; bei der mikroskopischen Untersuchung der Arterioli pulmonalis wurde jedoch festgestellt, dass das Wesentlichste des Gefässleidens in nekrotischen Veränderungen der Media und Adventitia, starker Verdickung der Adventitia mit lymphozytärer Infiltration der Randzone und Intimaproliferation, besonders der kleineren Arterienzweige, bestand. Schliesslich wurden sowohl knotenförmige, fibröse Adventitiaverdickungen, als kleine Aneurysmen beobachtet.

Im Mittelpunkt des Krankheitsbildes steht somit eine chronische Periarteriitis nodosa arteriae pulmonalis, die durch eine obliterierende Intimaproliferation die Hypertrophie der rechten Herzhälfte bedingt (Cor pulmonale) und hierdurch eine primäre Pulmonalsklerose vortäuscht.

Aus dem Studium der Literatur geht hervor, dass dieses Leiden in den meisten Fällen als ein *primär* obliterierendes Leiden der feineren Pulmonaläste aufgefasst werden muss, welches durch verschiedene Ursachen hervorgerufen wird und *sekundär* arteriosklerotische Veränderungen im Hauptstamm und den grösseren Verästelungen zur Folge hat.

LITTERATUR.

- Antenucci, A. J.: Wien. Arch. f. innere Med. 26, 197, 1935.
 Aust: Münch. med. Wochenschr. 1892, p. 689.
 Bacon & Apfelbach: Arch. of Pathology. 3, 801, 1927.
 Beitzke: Berliner klin. Wochenschr. 65, 1381, 1908.
 — Virch. Arch. 199, 214, 1910.
 Brecht, H.: Virch. Arch. 284, 126, 1932.
 Brenner, O.: Arch. of intern Med. 56, 211, 1935.
 Brinkmann: Münch. med. Wochenschr. 69, 703, 1922.
 Bryand & Hale White: Guy's Hosp. Report. 45, 17, 1901.
 Catrière, G.: Ann. de Med. 44, 30, 1938.
 Carling & Hicks: The Lancet. 204, 1001, 1923.
 Dickson, W. E.: The Lancet. 172, 226, 1907.

- Engelsen*: Deutsche med. Wochenschr. 1923. p. 1015.
Eppinger: Wien. Arch. f. innere Med. 1, 88, 1920.
Fishberg: Virchows Arch. 240, 282, 1923.
Fränkel: Münch. med. Wochenschr. 64, 1538, 1917.
Frey: Deutsche med. Wochenschr. 1923. p. 459.
Gerlach: Klin. Wochenschr. 1, 467, 1922.
Goedel, A.: Virchows Arch. 277, 507, 1930.
Guldner, A.: Virchows Arch. 249, 336, 1915.
Hall, S.: Journ. Am. med. Assoc. 110, 792, 1938.
Hart: Berl. klin. Wochenschr. 45, 1305, 1908 og 53, 304, 1916.
 — Virchows Arch. 240, 282, 1923.
Hauen, von: Virchows Arch. 227, 90, 1920.
Hoening, J.: Deutsche Arch. f. klin. Med. 180, 645, 1937.
Höra, J.: Frankf. Zeitschr. f. Pathologie. 47, 100, 1935.
Jermstad, Robert J.: Am. Journ. of clin. Path. 8, 573, 1938.
Kidd, Percy: Transactions of the clin. Society of London. 36, 218, 1903.
Killingsworth & Gibson: Am. Journ. of Diseases of Children. 57, 1099, 1939.
Kitamura: Zeitschr. f. klin. Med. 63, 14, 1908.
Klob: Wien. Wochenblatt. 21, 45, 1865.
Knauer: Centralbl. f. allg. Path. u. path. Anatomie. 63, 161, 1935.
Kopp, G.: Deutsche med. Wochenschr. 49, 1239, 1923.
Kroetz: Deutsches Arch. f. klin. Med. 133, 311, 1921.
Krutzsch, G.: Frankf. Zeitschr. f. Pathologie. 23, 243, 1920.
Kussmaul u. Maier: Deutsch. Arch. f. klin. Med. 1, 484, 1866.
Laache, S.: Norsk Mag. f. laegevidenskapen. 14, 51, 1899.
Lamb, A. P.: Arch. Int. Med. 14, 481, 1914.
Lange, G.: Deutsches Arch. f. klin. Med. 143, 359, 1924.
 — Virchows Arch. 248, 463, 1924.
Ljungdahl, M.: Untersuchungen über die Arteriosclerose des kleinen Kreislaufes. 1915. Wiesbaden.
 — Deutsches Arch. f. klin. Med. 160, 1, 1928.
Löwenstein, K.: Frankf. Zeitschr. f. Pathologie. 27, 1922.
MacCallum: Bull. Johns Hopkins Hosp. 49, 36, 1931.
Mertens, E.: Klin. Wochenschr. 1, 1841, 1922.
Meyer, P. S.: Berlin. klin. Wochenschr. 58, 473, 1921.
Mobitz: Deutsche Arch. f. klin. Med. 142, 115, 1923.
Motley, Lyle: Journ. Am. med. Assoc. 106, 898, 1936.
Muir & Bruce: The Lancet. 173, 226, 1907.
Mönckeberg: Zieglers Beiträge. 38, 101, 1905.
 — Deutsche med. Wochenschr. 33, 1243, 1907.
Norris, Robert F.: Bull. Johns Hopkins Hosp. 59, 143, 1936.
Oguro, Y.: Virchows Arch. 198, 554, 1909.

- Ophüls, W.*: Arch. of intern. Med. 32, 870, 1923.
Oszacki & Szechklin: Ann. de Med. 44, 105, 1938.
Paul: Wien. klin. Wochenschr. 39, 1123, 1926.
Posselt, A.: Ergebnisse d. allg. Path. u. path. Anat. 13, 298, 1909.
 — Wien. Arch. f. klin. Med. 11, 357, 1925.
 — Münch. med. Wochenschr. 1908, p. 1625.
 — Berlin. klin. Wochenschr. 53, 26.
Romberg, E.: Deutsch. Arch. f. klin. Med. 48, 197, 1891.
Rössle, R.: Münch. med. Wochenschr. 55, 337, 1908.
 — Virchows Arch. 288, 780, 1933.
Sanders, W. E.: Arch. of intern. Med. 3, 257, 1909.
Schütte, H.: Centralbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 25, 483, 1914.
Scupham & Takáts: Arch. of intern. Med. 56, 530, 1935.
Singer, H.: Arch. of intern. Med. 39, 865, 1927.
Stammmler, M.: Klin. Wochenschr. 16, 1937.
Steinberg, N.: Beitr. z. path. Anat. Ziegler. 82, 443, 1929.
Tschistowitsch: Compt. rend. Soc. Biol. 89, 627, 1923.
Tugendreich, J.: Ueber die Sklerose der Arteria pulmonalis. Diss. Berlin. 1912.
Ulrich: Annals of internal Med. 6, 632, 1933.
Wodynski, F.: Jahrb. d. bosn. hersegow. Landesspit. in Serajevo 1894—96. p. 814. cit. Posselt.
Wohlwill, F.: Virchows Arch. 246, 377, 1923.
Wolfram: Virchow-Hirsch Jahrb. 11, 147, 1883 (cit. M. Ljungdahl).
Yeo: Dublin Journ. of Med. Science. 55, 480, 1873.
Zemke, R.: Virchows Arch. 240, 30, 1922.
Zimmermann, O.: Wien. Arch. f. innere Med. 24, 301, 1934.
Zur Linden: Virchows Arch. 252, 229, 1924.

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG ÜBER KALBSHYPOPHYSENTTRANSPLANTATE BEI DER RATTE.*)

Von A. Westman und D. Jacobsen.

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. April 1941).

In den letzten Jahren wurde verschiedentlich versucht, aus therapeutischen Gründen Tierhypophysen bei Patienten mit Symptomen einer Hypophyseninsuffizienz einheilen zu lassen, und es wird auch über Erfolge mit dieser Behandlungsmethode berichtet. So sind günstig beeinflusste Fälle mit einem Morbus Simmond beschrieben worden (von *Bergmann* (1934), *Kylin* (1937) u. a.), und man hat bei Entwicklungsstörungen, hypophysärer Fettsucht und Amenorrhoeen manchmal einen guten Effekt gesehen, der zwar häufig nur temporär, aber unter Umständen auch dauerhaft war.

Die Frage, in welcher Weise das Hypophysengewebe seinen Einfluss ausübt, ist deshalb von besonderem Interesse, aber die Anschauungen hierüber weichen erheblich voneinander ab. *Ehrhardt* (1928), der als erster ausgedehntere Versuche mit einer Implantationstherapie anstellte, meint, dass die implantierten Zellen nicht weiter leben sondern resorbiert werden. Er hatte Gelegenheit, bei einigen Fällen Probeexcisionen 3 bis 5 Monate vorher implantierter Kalbshypophysen zu untersuchen und fand dabei, dass diese vollständig bindegewebig

*) Diese Untersuchung wurde mit Unterstützung der Stiftung »Therese och Johan Anderssons minne«, Karolinska Institutet, Stockholm, ausgeführt.

umgewandelt waren. Der therapeutische Effekt kommt nach *Ehrhardt* durch eine Resorption der grossen Hormonmenge, die der Vorderlappen enthält, zustande, und die so in den Organismus eingeführten endokrinen Substanzen regen dann seine eigenen innersekretorischen Organe zu stärkerer Tätigkeit an. Diese Anschauung *Ehrhardts* steht in gutem Einklang zu früheren Erfahrungen über die Einheilungsmöglichkeiten von Heterotransplantaten. Schon bei undifferenzierten Geweben ergeben sich hierbei grosse Schwierigkeiten, und es ist sehr unwahrscheinlich, dass ein Organ mit einer so komplizierten Struktur wie der Hypophysenvorderlappen einheilen kann.

Kylin (1936, 37) vertritt jedoch die Anschauung, dass mit der Überführung von Kalbshypophysen auf den Menschen nicht nur eine Implantation sondern eine Transplantation ausgeführt wird, bei der die Funktion des fremden Hypophysengewebes erhalten bleibt. *Kylin* begründet seine Ansicht hauptsächlich damit, dass sich, wie er beobachten konnte, der therapeutische Effekt beim Morbus Simmond erst nach einer relativ langen Latenzzeit einstellt. Dies sei damit zu erklären, dass es einige Zeit dauert, bevor die artfremde Hypophyse eingeheilt ist und wieder funktioniert. *Kylin* stützt sich ausserdem auf einige anatomische Beobachtungen und Tierversuche. So fand er relativ lange Zeit nach Kalbshypophysenimplantationen beim Menschen augenscheinlich normale Vorderlappenzellen und konnte dieselbe Feststellung auch nach Transplantationen beim Kaninchen machen. Nach $\frac{1}{2}$ bis 3 Monaten nach einer Transplantation in das Peritoneum des Kaninchens seien die Zellen gut erhalten gewesen. Zentral fanden sich zwar Nekrosen, die Randzone aber zeigte ein Bild, das mit dem mikroskopischen Aussehen des normalen Vorderlappens völlig übereinstimmte. Die verschiedenen Zellarten waren deutlich zu unterscheiden und das Gewebe gut vaskularisiert. Die Funktion der transplantierten Drüse konnte jedoch nicht beurteilt werden, da die Transplantationen nicht bei hypophysenlosen Tieren ausgeführt wurden.

In der vorliegenden Untersuchung wird die Frage nach

der funktionellen Einheilung artfremden Hypophysengewebes experimentell untersucht.

In einer früheren Arbeit (1940) über Auto- und Homoio- transplantationen des Hypophysenvorderlappens der Ratte konnte gezeigt werden, dass man gute Resultate erhält, wenn die Hypophyse in die vordere Augenkammer eingesetzt wird. Die Transplantate zeigten intakte, wenn auch in bestimmter Weise veränderte Zellen, und waren reichlich vaskularisiert. Jedoch kam es zu bestimmten Veränderungen der hormonalen Aktivität. So konnte keine Produktion gonadotroper Hormone festgestellt werden. Trotz guter Einheilung der Transplantate wiesen die Genitalorgane hypophysenloser Wirtstiere eine hochgradige Atrophie auf. Die Transplantate waren aber nicht in jeder Beziehung wirkungslos. Junge hypophysektomierte Tiere wuchsen, und der Allgemeinzustand aller Ratten war wesentlich besser, als er sonst nach einer Hypophysenentfernung zu sein pflegt. Ferner konnte auch die sonst nach einer Hypophysektomie auftretende starke Atrophie der Nebennieren durch die Transplantation erheblich vermindert werden. Die Störung der gonadotropen Funktionen hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass der transplantierte Vorderlappen keine nervösen Verbindungen mehr hat.

Da durch die eben erwähnten Untersuchungen ein reichhaltiges Material über gut eingeheilte Hypophysentransplantate und Erfahrungen über die Transplantationsmethode gesammelt worden waren, wird in der hier vorliegenden Untersuchung über Heterotransplantationen dieselbe Technik benutzt.

Ca. 20 bis 30 Minuten nach der Schlachtung wurde eine Kalbshypophyse in kleine Stücke geschnitten und einige dieser durch eine kleine Öffnung im Corneoscleralrand in die vordere Kammer beider Augen der Versuchstiere gelegt. Die Menge des eingeführten Vorderlappengewebes entsprach dabei ungefähr der einer normalen Rattenhypophyse.

Zur Beurteilung des Erfolges wurden das mikroskopische Aussehen der Transplantate und die Ovarial- und Nebennierengewichte festgestellt. Auch der mikroskopische Bau der

Nebennieren, insbesondere im Hinblick auf das Vorhandensein einer sudanophoben Rindenzone, die infolge der Hypophysektomie zustande kommt, wurde untersucht. Endlich registrierten wir auch das Körpergewicht der noch nicht ausgewachsenen hypophysenlosen Tiere, um festzustellen, ob das Transplantat einen Einfluss auf die Wachstumskurve ausübt. Die Resultate gehen aus den folgenden Tabellen hervor.

Tabelle I.

Erwachsene Ratten, bei denen die Transplantation und Hypophysektomie gleichzeitig ausgeführt wurden.

Nr.	Ovar I: Nebenniere I:			Ovar II: Nebenniere II:			Transplantat
	Gew. mg	Gew. mg.	Zone	Gew. mg	Gew. mg	Zone	
1	15	14	schmal	9	8	mittelbreit	völlig resorbiert, durch Bindegewebe ersetzt.
2	12	14	"	6	9	breit	"
3	9	13	"	6	11	"	"
4	20	17	mittelbreit	14	12	"	"
5	14	13	schmal	10	10	mittelbreit	"

Einen Monat nach der Transplantation wurden das Ovar I und die Nebenniere I exstipiert und untersucht. Zwei Monate nach der Transplantation wurden die Tiere obduziert und die Transplantate, das Ovar II und die Nebenniere II untersucht. Bei Fall 1—3 fand sich mikroskopisch ein kleiner abgekapselter Drüsenrest im Hypophysenbett. Fall 4 und 5 waren vollständig hypophysektomiert.

Die Tabelle I enthält Versuche an erwachsenen Ratten, bei denen gleichzeitig mit der Transplantation eine Hypophysektomie vorgenommen wurde. 2 Monate nach der Operation war das Transplantat bei allen Fällen resorbiert und durch Granulationsgewebe ersetzt. Aus den Gewichten und der Ausbildung der sudanophoben Zone geht hervor, dass die

Tabelle II.

Im Alter von 2 Monaten hypophysektomierte Ratten, bei denen die Transplantation 42 Tage nach der Hypophysektomie ausgeführt wurde.

Gleichzeitig mit der Transplantation wurden Ovar I und Nebenniere I exstirpiert und untersucht und das Körpergewicht festgestellt. Entsprechende Untersuchungen wurden vorgenommen, als die Tiere zu verschiedenen Zeiten nach der Transplantation obduziert wurden. Bei allen Fällen zeigte die histologische Untersuchung des Hypophysenbettes, dass kein Drüsenrest vorhanden war.

Nr.	K.G.*)	Ovar I:		Nebenniere I:		Obduktion:		K. G.		Ovar II:		Nebenniere II:		Transplantat.
	g	Gew. mg		Gew. mg	Zone	Tagz post transplant.		g		Gew. mg		Gew. mg	Zone	
1	110	5		7	mittel- breit	4		125		5		6	mittel- breit	nekrotisches Hyp. Gewebe
2	120	—		4	„	5		140		10		7	breit	„
3	115	14		6	„	21		117		13		8	„	völlig resorbiert
4	115	10		8	breit	29		110		11		6	„	„
5	125	16		7	mittel- breit	42		125		8		6	„	„
6	125	10		6	„	49		135		7		6	„	„
7	145	18		10	„	59		155		11		9	„	„
8	120	atroph. Testis		5	breit	14		130		atroph. Testis		6	„	„
9	135	„		3	„	35		135		„		—	—	„

*) = Körpergewicht bei der Transplantation, d. h. 42 Tage nach der Hypophysektomie.

einen Monat nach der Hypophysektomie und Transplantation vorhandene Atrophie der Ovarien und Nebennieren nach einem weiteren Monat noch zugenommen hatte.

In der Tabelle II sind die Versuche zusammengestellt, bei denen die Transplantationen bei Ratten ausgeführt wurden, deren Hypophyse im Alter von ca. 2 Monaten entfernt worden war. Schon nach 4 Tagen zeigte das Transplantat einen nekrotischen Zerfall und erwies sich bei später vorgenommenen Untersuchungen als vollständig resorbiert. Dass das artfremde Vorderlappengewebe keine nachweisbare dauerhafte hormonale Wirkung hatte, geht aus Folgendem hervor. Die Versuchstiere wuchsen nicht normal. Die Ovarialgewichte waren erheblich vermindert und bei mehreren Fällen niedriger als zu dem Zeitpunkt, an dem die Transplantation ausgeführt wurde. Die Testis der beiden Männchen waren atrophisch. Ebenso zeigten alle Nebennieren eine hochgradige Atrophie mit einer breiten sudanophoben Rindenzone.

Als Ergänzung zu den in der Tabelle II zusammengestellten Versuchen wurde der Kalbshypophysenvorderlappen noch bei 10 Tieren, die ebenso alt wie die hypophysenlosen Ratten der Tabelle II waren und deren Hypophyse nicht entfernt worden war, transplantiert. Diese Versuche sind in der folgenden Tabelle III zusammengestellt.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, wurde das Transplantat bei 2 Fällen am 4-ten und 5-ten Tage nach der Operation untersucht, an denen es schon nekrotisch zerfallen war. Bei später vorgenommenen Untersuchungen, die letzten 59 Tage nach der Operation, erwies sich das Transplantat als vollständig resorbiert. Diese Tiere, die ein normales Körpergewicht und auch normale Ovarial- und Nebennierengewichte haben, bilden ein gutes Vergleichsmaterial zu den in der Tabelle II angegebenen Versuchen. Die Unterschiede der Organ- und Körpergewichte aller dieser Tiere, die gleichen Alters waren, sind deutlich.

Die vorliegende Untersuchung zeigt also, dass das Hypophysenvorderlappengewebe des Kalbes nach einer Überfüh-

Tabelle III.

Gleichalte wie die in der Tabelle II angeführten Tiere, deren Hypophyse nicht entfernt, und bei denen die Transplantationen und die übrigen Untersuchungen parallel mit denen der hypophysenlosen, in der Tabelle II angeführten Fälle ausgeführt wurden.

Nr.	K.G. *)	Obduktion:	K. G.:	Ovar:	Nebenniere:	Transplantat:
		Tage post transplant.	g	Gew. mg	Gew. mg	
1	—	4	185	30	31	nekrotisches Hyp. Gewebe
2	170	5	—	30	33	„
3	165	14	175	39	35	völlig resorbiert
4	165	21	175	33	30	„
5	155	29	205	30	26	„
6	180	35	215	45	42	„
7	170	42	200	27	38	„
8	175	49	215	42	40	„
9	195	59	215	41	48	„
10	205	59	240	48	54	„

*) = Körpergewicht 4 Tage nach der Transplantation.

rung auf die Ratte schnell degeneriert und keine dauerhafte hormonale Wirkung hat.

Zusammenfassung.

In die vorderen Augenkammern erwachsener und juvenil hypophysektomierter und normaler erwachsener Ratten wurden Kalbshypophysenvorderlappen transplantiert. Bei sämtlichen Tieren kam es zu einer Nekrose und folgenden Resorption der Transplantate. Die Ovarien und Nebennieren der

hypophysenlosen Ratten mit den Transplantaten wiesen eine hochgradige Atrophie auf, und das Wachstum der juvenil operierten Tiere blieb gehemmt. Die Transplantate haben, wie aus diesen Beobachtungen hervorgeht, keine dauerhafte hormonale Wirkung.

LITERATUR.

- v. *Bergmann*, G.: Deutsch. Klin. Wschr. 60, 1934, 123, 159.
Ehrhardt, K.: Halban-Seitz: Biologie u. Pathologie d. Weibes, 8, 2, 1928, 44.
Ehrhardt, K. u. *Ch. Kittel*: Zeitschr. Klin. Med. 1937, 132.
Kylin, E.: Acta Med. Scand. 91, 1937, 428. — Svenska Läkartidn. 33, 1936, 385, 1009.
Westman, A. u. *D. Jacobsohn*: Acta Path. Microbiol. Scand. 47, 1940, 328.

ÜBER DIE STRUKTUR DER SCHILDDRÜSE NACH HYPOPHYSENSTIELDURCHTRENNUNGEN BEIM KANINCHEN.*)

Von A. Westman, D. Jacobsohn und H. Okkels.
(Eingegangen bei der Redaktion am 25. April 1941).

Durch mehrfache Untersuchungen (*Aschner*, 1912, *Dott*, 1923, *Smith*, 1926, 1930, u. a.) ist festgestellt worden, dass es nach einer Exstirpation des Hypophysenvorderlappens zu sehr auffallenden Veränderungen der Schilddrüse kommt. Schon makroskopisch ist die Drüse kleiner als normal. Mikroskopisch erscheinen die Follikel häufig grösser, aber manchmal auch kleiner als sonst. Das Parenchym weist eine in dieser Beziehung unregelmässige Struktur auf. Das Epithel ist in der Regel niedrig. Kolloid findet sich reichlich und stark gefärbt. Die hormonale Funktion der Schilddrüse ist erheblich herabgesetzt, und dieses beruht darauf, dass die Abgabe thyreotropen Hormons aufgehört hat.

Westman und *Jacobsohn* fanden bei früheren Untersuchungen, dass es durch eine Durchtrennung des Hypophysenstiels zu einer Herabsetzung der Produktion gonadotroper Hormone des Vorderlappens kommt. Es erschien deshalb von Interesse zu untersuchen, ob dieser Eingriff auch die thyreotrope Funktion der Hypophyse beeinträchtigt und die histologische Struktur der Schilddrüse verändert.

*) Diese Untersuchung wurde mit Unterstützung der Stiftung »Therese och Johan Anderssons minne«, Karolinska Institutet, Stockholm, ausgeführt.

Bisher veröffentlichte Arbeiten, die näher auf diese Frage eingehen, sind von *Uotila* ausgeführt worden. Dieser durchtrennte den Hypophysenstiel auf parapharyngealem Wege bei der Ratte und stellte Folgendes fest. Nach dem Eingriff wird noch genügend thyreotropes Hormon produziert, um die histologische Struktur der Schilddrüse aufrecht zu erhalten. Dies zeigt sich am deutlichsten bei einer Bestimmung des Höheindex der Zellen, der durch die Stieldurchtrennung nicht verändert wird. Weiterhin führt eine Vermehrung oder Verminderung der Thyroxinmenge des Organismus bei den stieldurchtrennten Tieren zu denselben Veränderungen wie bei den normalen.

Dagegen kommt es zu einer funktionellen Störung, die sich darin kundtut, dass die Schilddrüse auf einen Kältereiz nicht mehr in normaler Weise reagiert. Die nach diesem regelmässig auftretende Hypertrophie fehlt bei den stieldurchtrennten Tieren.

Auf Grund seiner Untersuchungen kommt *Uotila* zu der Anschauung, dass der Hypophysenvorderlappen einen basalen, auf humoralem Wege regulierten Sekretionsrythmus hat, der unabhängig von den Einflüssen des Gehirns ist. Unter besonderen Umständen, wie z. B. nach einer Kältereizung, spielen jedoch die nervösen Impulse aus dem Hypothalamus, die durch den Stiel zum Hirnanhang gelangen, eine bedeutungsvolle Rolle.

Schon in einer der ersten Arbeiten von *Westman* und *Jacobsen* (1938) über die nach einer Stieldurchtrennung auftretenden Veränderungen konnte festgestellt werden, dass die *Glandula thyreoidea* bei einigen Fällen eine normale histologische Struktur aufzuweisen schien, während in anderen Fällen das mikroskopische Bild auf eine Herabsetzung der Funktion deutete.

Im Zusammenhang mit weiteren Untersuchungen über den Effekt einer Hypophysenstieldurchtrennung auf die Genitalorgane des Kaninchens (1940) wurden auch die Schilddrüsen der operierten Tiere einer eingehenderen histologischen Analyse unterzogen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen im Folgenden mitgeteilt werden.

Das Material umfasst insgesamt 21 operierte Fälle. Bei 7 davon wurde der Hypophysenstiel erwachsener Kaninchen durchtrennt, bei 7 anderen ist dieselbe Operation bei juvenilen Tieren ausgeführt worden. Bei allen diesen Fällen war es zu einer ausgesprochenen Atrophie der Gonaden gekommen, und die Hypophyse hatte charakteristische Veränderungen gezeigt. Ihr Gewicht war niedriger als normal, eosinophile Zellen fehlten, und die vorhandenen Vorderlappenzel-

len erschienen gleichmässig geformt und etwas kleiner als normal. Zirkulationsstörungen waren jedoch niemals zu finden. Der Hinterlappen zeigte bei allen Fällen degenerative Veränderungen.

Zu dem Material gehören ferner 4 Fälle, bei denen der Stiel nur teilweise durchtrennt war, und 3 Fälle mit einer vollständigen Durchtrennung, aber einer Regeneration von Drüsengewebe oberhalb der Trennungsstelle. Bei allen diesen 7 Fällen waren die Gonaden normal oder nur wenig verändert.

Endlich wurde auch zum Vergleich mit früheren Literaturangaben die Schilddrüse eines Kaninchens, dessen Hypophyse vollständig entfernt worden war, untersucht.

Die histologische Bearbeitung des Schilddrüsenmaterials führte *Okkels* aus.

Das Material war in 10 % Formalin fixiert worden und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden in gewöhnlicher Weise mit Böhmer und Heidenhain Hämatoxylin gefärbt.

Da Variationen des Schilddrüsenbildes durch verschiedenartige Kost, Temperatureinflüsse etc. zustande kommen können, soll erwähnt werden, dass die Tiere während der langen Zeit nach der Operation im gleichen Raum und bei gleicher Kost gehalten wurden.

Bei dem erwachsenen Tiere mit einer Hypophysektomie und Untersuchung der Schilddrüse 4 Monate nach der Operation findet man, dass das Parenchym ein relativ polymorphes Aussehen hat, und sowohl kleine wie grosse Follikel vorhanden sind. Die grossen sind mit einem platten, an einigen Stellen extrem atrophischen Epithel ausgekleidet und mit einem dichten, homogenen Kolloid angefüllt, dass so gut wie garnicht vakuolisiert ist. An mehreren Stellen ist ein eigentümliches, zentrifugales Herauswachsen von Tochterfollikeln zu beobachten, so dass sich peripher um die grossen Follikel zahlreiche, mit Kolloid gefüllte kleinere Blasen finden, deren Epithel ebenfalls niedrig ist. Vereinzelt treten sowohl in den kleinen wie in den grossen Follikeln stark angeschwollene Epithelzellen auf. Das morphologische Bild zeugt von einer

Tabelle I.
Stieldurchtrennungen bei erwachsenen Tieren.

Thyreoididea:

Thyreoidae.

Funktion

Nr.	Untersucht	Ovarien	Parenchym Aussehen	Epithel	Kolloid	Funktion
	Mon. p. op.					
1	2	atroph.	gleichförmig mit kleinen Follikeln	platt	wenig, schwach gefärbt	erheblich herabgesetzt
2	2	mässige Atrophie	wechselnd, grosse, aber auch kleine Follikel.	niedrig, einige angescwollene Zellen.	dicht und stark gefärbt in den grösseren Follikeln.	gering
3	2	"	gleichförmig, grössere u. mittelgrosse Foll.	platt	homogen und stark gefärbt	herabgesetzt
4	5	atroph.	wechselnd, grössere u. kleine Foll.	platt in den grösseren, angescchw. in den kleinen Foll.	dicht in den grösseren wenig in den kleinen Follikeln	gering
5	6	"	wechselnd, grosse u. kleine Follikel	platt in den grossen, kubisch in den kleinen Follikeln	dicht in den grossen, wenig in den kleinen Follikeln	erheblich herabgesetzt
6	9	"	etwas verschiedenartig, hptschl. kleine Follikel	kubisch, einige abgeplat. mehrere angescchw. Zellen	wenig färbbar, stark vakuolisiert	etwas erhöht
7	8	"	wechselnd, kleinere und kleine Follikel	abgeplattet in den grossen, niedrig zylindr. in den kleinen Follikeln	stark gefärbt in den kleinen Follikeln	herabgesetzt

45

sehr geringen Aktivität der Drüse, und entspricht dem in der Literatur angegebenen.

Die Resultate der Untersuchungen an den stieloperierten Tieren werden im Folgenden tabellarisch angegeben.

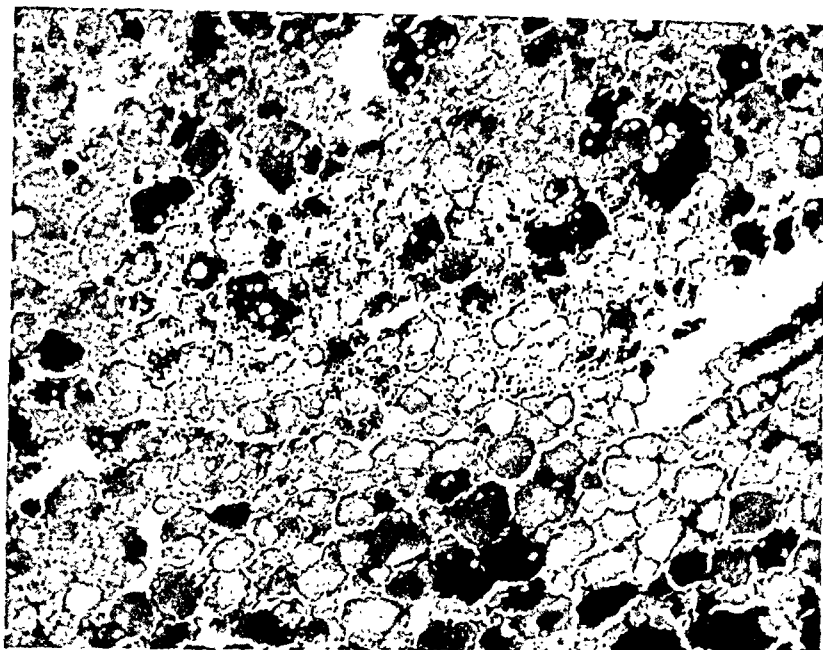


Fig. 1.

Tab. II, Nr. 6, untersucht 9 Mon. p. operat.

Gl. Thyr. zeigt wechselnd viele kleine, wenige grössere Follikel.
Funktionszustand als etwas herabgesetztes geschätzt.

Die Tabelle zeigt, dass das Parenchym bei 5 der 7 untersuchten Fälle eine ungleichmässige Struktur mit sowohl grösseren wie kleineren Follikeln aufweist. Das Epithel der grösseren ist platt, der kleineren zylindrisch oder kubisch. Bei einigen Fällen findet sich bei einem Teil der Epithelzellen eine eigentümliche Anschwellung, und es entstehen Bilder, wie man sie bei der Schilddrüse der Katze nach Perfusion mit der Carrel-Lindberg'schen Oxygenatorpumpe mit Tyrode-Serum während einiger Tage sehen kann. Bei 2 Fällen ist das

Parenchym gleichmässiger aufgebaut. Bei allen Fällen ausser einem scheint die Drüsentätigkeit nach dem morphologischen Aussehen nur gering oder erheblich herabgesetzt gewesen zu sein.

Bei 5 der 7 in der Tabelle II angeführten Fälle ist die

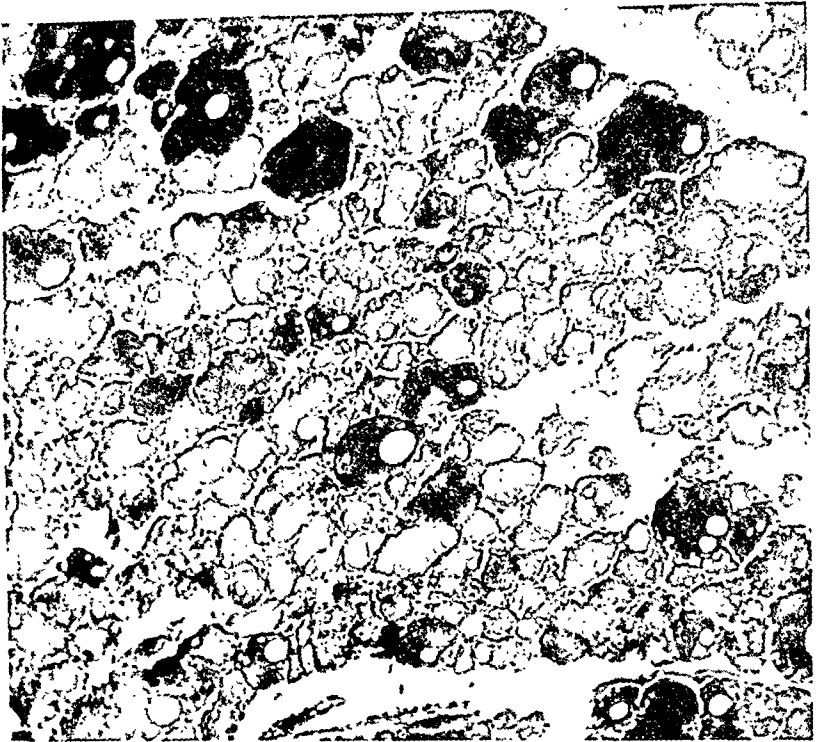


Fig. 2.

Tab. IV, Nr. 1 c, untersucht 9 Mon. p. operat.

Gl. Thy. zeigt wechselnd kleine und grössere Follikel.

Funktionszustand als etwas herabgesetztes geschätzt.

Struktur des Parenchyms gleichmässig. Das Epithel ist platt, in einigen Fällen sind jedoch die oben erwähnten angeschwollenen Zellen vorhanden. Das Kolloid erscheint dicht und stark färbbar. Nach histologischer Beurteilung ist die Aktivität herabgesetzt. Bei 2 Fällen (5 und 7) hat das Parenchym ein wechselndes Aussehen und enthält aktive Follikel. Hier scheint die Funktion normal gewesen zu sein.

Tabelle II.
Stieldurchtrennungen bei juvenilen Tieren.

Thyreoidea

Nr.	Untersucht		Geschlecht	Genital- Organe	Thyreoidea		Funktion
	Mon.	p. op.			Parenchym Aussehen	Epithel	
1	7		♀	atroph.	gleichförmig, mittelgrosse Follikel	platt	herabgesetzt
2	7		♀	"	gleichförmig, mittelgrosse u. kleine Follikel	platt, vereinzelt aufgeblasen	etwas herabgesetzt
3	7		♀	"	gleichförmig, grosse Follikel	platt	herabgesetzt
4	8		♂	"	gleichförmig, relativ grosse Follikel	platt	herabgesetzt
5	9		♀	"	gleichförmig, ziemlich kleine Follikel	niedrig	stark herabgesetzt
6	9		♀	"	wechselnd, viele kleine, wenige grössere Follikel	platt in den grösseren, hoch u. häufig angeschwollen in den kleinen Follikeln	wahrscheinlich etwas herabgesetzt
7	9		♀	"	meist mittelgrosse, wenige kleinere Follikel	platt, kubisch in den mittelgrossen und niedrig zylindrisch in den kleineren Follikeln. In letzteren einige angeschwollene Zellen	normal

Tabelle III.

Unvollständige Stieldurchtrennung. (e = erwachsene, j = juvenil operierte Tiere).

Nr.	Untersucht		Geschlecht	Genitalorgane	Thyreoidea			
	Mon. p. op.				Parenchym Aussehen	Epithel	Kolloid	Funktion
1 e	2		♀	normal	gleichförmig mittelgrosse Follikel	kubisch	schwach gefärbt, einige Vakuolen	normal
2 j	9		♀	"	wechselnd, grössere und kleinere Follikel	meist platt oder kubisch	stark gefärbt in den mittelgrossen Follikeln	wahrscheinlich herabgesetzt, leicht Dysregulation
3 j	9		♂	"	wechselnd, mittelgrosse u. kleine Follikel	hoch, häufig stark angeschwollen	wenig, schwach gefärbt, vakuolisiert	kräftig
4 j	11		♀	"	gleichförmig, meist kleine Follikel	hoch, angeschwollen	wenig, schwach gefärbt, stark vakuolisiert	kräftig

Von den 4 in der Tabelle III angeführten Fällen sind 3 juvenil, und 1 (Fall 1) ein erwachsen operiertes Tier. Bei Fall 1, 3 und 4 sind aktive Follikel vorhanden, und die Funktion scheint normal oder vermehrt gewesen zu sein. Bei Fall 2 ist sie vielleicht etwas herabgesetzt oder es liegt eine Dysregulation vor.

Im Fall 1 der in der Tabelle IV zusammengestellten 3 Versuche wurde die Stieldurchtrennung bei einem erwachsenen, in den beiden übrigen bei juvenilen Tieren vorgenommen. Die Struktur des Parenchyms ist bei allen Fällen ungleichmässig, und es findet sich aktive Follikel. Bei den 2 ersten Fällen scheint die Funktion etwas herabgesetzt gewesen zu sein. Der dritte Fall weist Zeichen einer erhöhten Aktivität auf.

Die vorhandenen Beobachtungen stimmen mit den früheren von *Westman* und *Jacobsohn* gut überein. In der überwiegenden Anzahl der Fälle mit durchtrenntem Hypophysenstiel zeigt die Schilddrüse Zeichen einer herabgesetzten Aktivität, und die Struktur des Parenchyms gleicht im wesentlichen der, die man bei hypophysenlosen Tieren findet.

Ausnahmen von dieser Regel sind jedoch vorhanden. Die Schilddrüsenfunktion eines erwachsen und 2 juvenil operierter Tiere scheint normal gewesen zu sein, und das Parenchym enthielt bei diesen Fällen auch aktive Follikel. Diese Fälle wiesen ebenso wie die übrigen eine ausgesprochene Atrophie der Genitalorgane auf, und es scheint also, als ob die thyreotrope Funktion des Vorderlappens nicht ebenso abhängig von einer normalen Verbindung mit dem Hypothalamus ist, wie die gonadotrope.

Die in der Tabelle III angeführten Fälle mit einer unvollständigen Stieldurchtrennung sind deshalb von Interesse, weil bei ihnen die Traumatisierung der Hypophyse und der Hirnbasis dieselbe gewesen sein muss wie bei den Tieren deren Hypophysenstiel vollständig durchtrennt wurde. Da die thyreotrope Funktion des Vorderlappens hier nicht gestört war, kann also das Operationstrauma an sich nicht die Verände-

Tabelle IV.
Regeneration hypophysären Drüsengewebes nach vollständiger Stieldurchtrennung.
(e = erwachsene, j = juvenil operierte Tiere).

Nr.	Untersucht		Geschlecht	Genitalorgane	Thyreoidca:			Funktion
	Mon.	p. op.			Parenchym Aussehen	Epithel	Kolloid	
1 e		9	♀	normal	wechselnd, kleine und grössere Follikel	platt in den grösseren, kubisch oder zylindrisch u. teils aufgeblasen in den kleinen Follikeln	dicht und gefärbt in den grösseren, schwach gefärbt und vakuolisiert in den kleinen Follikeln	vielleicht etwas herabgesetzt
2 j		12	♂	"	wie das vorige	wie das vorige	wie das vorige	etwas herabgesetzt
3 j		10	♂	"	wechselnd, mittel-grosse u. kleinere Follikel	hoch, vielfach stark angeschwollen	wenig, vakuolisiert	erhöht

rungen verursacht haben, die bei den meisten Fällen nach einer vollständigen Durchtrennung auftraten.

Aus den Fällen der Tabelle IV geht hervor, dass das oberhalb der Trennungsstelle vorhandene, regenerierte hypophysäre Drüsengewebe nicht nur gonadotropes, sondern auch thyreotropes Hormon produzieren kann.

Zusammenfassung.

Nach Durchtrennung des Hypophysenstiels beim Kaninchen, die sowohl bei erwachsenen wie juvenilen Tieren ausgeführt wurde, findet sich bei 11 von 14 Fällen ein mikroskopisches Schilddrüsenbild, dass von einer herabgesetzten Funktion zeugt. Bei den übrigen 3 Fällen scheint die Funktion normal gewesen zu sein. Alle Fälle hatten eine hochgradige Genitalatrophie. Es scheint, als ob die thyreotrope Funktion des Vorderlappens nicht so abhängig von dem Vorhandensein einer normalen Verbindung zwischen der Hypophyse und dem Hypothalamus ist, wie es sich für die gonadotropen Funktionen gezeigt hat.

LITERATUR.

- Aschner, B.: Pflügers Arch. 146, 1912, 1.
 Dott, N. M.: Quart. J. exp. Physiol. 13, 1923, 241.
 Smith, P. E.: Anat. Rec. 32, 1926, 221.
 — Am. J. Anat. 45, 1930, 205.
 Uotila, U.: Endocrinology, 25, 1939, 63, 605.
 — ibid. 26, 1940, 129.
 Westman, A. u. D. Jacobsohn: Acta Obst. Gyn. Scand. 18, 1938, 109.
 — ibid. 20, 1940, 392.

ZUR SEROLOGIE DER DYSENTERIE-GRUPPE.

Von F. Kauffmann.

(Eingegangen bei der Redaktion am 2. Mai 1941).

Wie kürzlich erwähnt, stiess ich bei Untersuchungen über das Vorkommen von Salmonella-Antigenen in anderen Bakterien-Gruppen auf Antigenbeziehungen zwischen Salmonella- und Dysenterie-Bakterien, und zwar speziell bei bestimmten Typen der sogenannten »Flexner-Gruppe« (Pseudodysenterie-Bakterien nach Kruse). Im Verlaufe dieser serologischen Untersuchungen stellte sich die Notwendigkeit heraus, über die Serologie der verschiedenen Dysenterie-Typen, mit denen ich mich bisher nur wenig befasst hatte, eingehender zu arbeiten.

Wie man aus der grossen Ruhr-Literatur ersieht, liegen zwar von verschiedenen Seiten serologische Untersuchungen über die Dysenterie-Bakterien vor, doch haben diese Arbeiten bisher nicht dazu geführt, dass man ganz allgemein in der täglichen Praxis serologische Typendiagnosen stellt. Man begnügt sich in der Regel mit der Sammeldiagnose »Flexner-Gruppe«, sofern es sich um einen Stamm handelt, der sich kulturell typisch verhält und von einem der üblichen »Flexner«-Serien agglutiniert wird. Dieses Vorgehen, das keineswegs dem tatsächlichen Stande der Wissenschaft entspricht, ist praktisch bedenklich, da man auf diese Weise epidemiologische Zusammenhänge ausser Betracht lässt und nicht mit Sicherheit alle abweichenden serologischen Typen erfassen kann.

Der Grund für diese Einstellung liegt wahrscheinlich in der Auffassung, dass die Serologie dieser Bakteriengruppe zu verwickelt und schwierig sei, um in der täglichen Praxis angewandt zu werden. Ich glaube, dass diese Annahme vor allem durch die bekannten Untersuchungen von *F. W. Andrewes* und *A. C. Inman* veranlasst wurde, weil in dieser Arbeit die *quantitativen* Antigendifferenzen über Gebühr hinaus in den Vordergrund gestellt wurden. Würde es sich nämlich tatsächlich in erster Linie nur um quantitative Unterschiede handeln, so wäre eine einfache und sichere Typendiagnose sehr erschwert, ja eventuell in Frage gestellt, jedenfalls für die praktische Diagnose. Es geht aber bereits aus den Untersuchungen von *Kruse* und seinen Mitarbeitern *Rittershaus*, *Kemp* und *Metz* sowie aus vielen folgenden Arbeiten von *K. Aoki*, von *K. Murakami*, von *D. Kalic*, von *F. Sartorius*, von *F. Sartorius* und *H. Reploh*, von *K. W. Clauberg*, von *K. Nagakura* u. a. hervor, dass zwischen den einzelnen Typen nicht nur quantitative, sondern auch *qualitative* Unterschiede bestehen, mit deren Hilfe eine praktisch brauchbare Typendifferenzierung möglich sein muss. Dieses zeigen besonders deutlich die Arbeiten von *K. W. Clauberg*, die von *W. Kan* bestätigt wurden.

In den hier vorliegenden Untersuchungen war es mein Hauptziel, die diagnostisch wichtigsten, *qualitativen* Antigendifferenzen zu erfassen und gleichzeitig einen Einblick in den serologischen Formenwechsel innerhalb der Dysenterie-Glatzformen zu gewinnen. Da mir alle in Betracht kommenden Dysenterie-Typen nicht zur Verfügung standen und unter den gegenwärtigen Verhältnissen auch nicht erreichbar waren, so musste ich meine Untersuchungen auf einige der wichtigsten Typen, die ich erhalten konnte, beschränken. Hierbei bin ich mir darüber klar, dass es bedenklich ist, serologische Untersuchungen nur an sehr alten Laboratoriumskulturen durchzuführen, da solche Kulturen, selbst wenn sie äusserlich glatt und normal aussehen, doch Verlustvarianten in antigener Hinsicht sein können. Da man aber im Beginn seiner serologischen Untersuchungen auf alte Testkulturen angewiesen ist, wenn man die Resultate anderer Autoren nachprüfen und ergänzen

will, so sind die ersten orientierenden Untersuchungen mit einem gewissen Vorbehalt aufzunehmen und später an frisch isolierten Kulturen zu bestätigen.

Das untersuchte Material.

Aus der Sammlung von Dr. M. Kristensen, dem ich auch an dieser Stelle bestens danke, erhielt ich folgende Kulturen:

- 1) A 531 von Kruse.
- 2) D 118 " "
- 3) E 65 " "
- 4) H 39 " "
- 5) I 471 " "
- 6) Schmitz VII. K 1.
- 7) Stansfield V Z von *Andrewes* und *Inman*.
- 8) Mountain W X " " " "
- 9) Oxford W " " " "
- 10) Hiss-Russell Y " " " "
- 11) Whittington Z " " " "
- 12) Hughes X " " " "

Da dieser Stamm völlig rauh war, wurde er nicht näher untersucht.

- 13) Shiga Ross.

Ausserdem habe ich einige frisch in der Diagnose-Abteilung des Instituts isolierte Kulturen untersucht, die teils zum D-, E- oder H-Typ gehörten.

Zur Erleichterung der Übersicht sei das Ergebnis meiner Typenbestimmungen vorweg genommen:

Zum A-Typ gehören: A 531 von *Kruse* und Stansfield V Z.

Zum D-Typ gehören: D 118 von *Kruse* und Hiss-Russell Y.

Zum H-Typ gehören: H 39 von *Kruse* und Whittington Z.

Zum I-Typ gehören: I 471 von *Kruse* und Schmitz VII. K 1.

Zum E-Typ gehören: E 65 von *Kruse* und mehrere frisch isolierte »Sonne«-Kulturen.

Die Stämme Mountain W X und Oxford W gehören zu 2 besonderen Typen, von denen der letzte dem A-Typ nahe steht, während der erste nähere Beziehungen zum D-Typ hat. Der von mir nicht näher untersuchte Stamm Hughes X gehört

auf Grund der Untersuchungen von *Andrewes* und *Inman* zu einem weiteren, selbständigen Typus. Zur »Flexner-Gruppe« gehören die Typen A, D, H sowie die Kulturen Mountain W X, Oxford W und Hughes X. Die beiden Typen E (= *Sonne*) und I (= *Schmitz*) stehen bekanntlich ausserhalb dieser Gruppe.

Die Herstellung der Immunseren.

Von den oben erwähnten Kulturen wurden folgende Immunseren hergestellt:

A. Mit Formalin-Bouillonkulturen:

A 531 plus-Form, A 531 minus-Form, Stansfield V Z, D 118, Hiss-Russell Y, H 39, Whittington Z, Mountain W X plus-Form, Mountain W X minus-Form, Oxford W, E 8980/41 Glatt-Form (frisch isoliert) und D 118 + H 39 (polyvalent).

B. Mit gekochter Bouillonkultur (2½ Stunde 100° C.):

A 531 plus-Form, D 118, H 39, I 471 und Schmitz VII. K 1.

Ausserdem benutzte ich zur Kontrolle 3 Seren der Diagnose-Abteilung des Instituts (A, D und H), die mit Formalin-Bouillonkulturen hergestellt waren.

Da zwischen den Seren, die mit Formalinbouillon- oder mit gekochter Bouillon-Kultur hergestellt waren, kein prinzipieller Unterschied bestand, so sollen im folgenden nur die Resultate, die mit den Formalinbouillon-Seren erzielt wurden, dargestellt werden.

Zu einer ca. 20 std. Bouillonkultur wurde 0,5 % Formalin (40 % Formalin als Ausgangspunkt) hinzugefügt, worauf die Kultur 24 Stunden im Thermostat von 37° C. blieb und dann im Eisschrank aufbewahrt wurde. Pro Stamm wurden 3 Kaninchen i. v. immunisiert und zwar in 5 tägigen Zwischenräumen mit 0,1 — 0,25 — 0,5 — 1,0 und 2,0 ccm Formalinbouillon-Kultur. 6 Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen entblutet. Die Seren von je 3 Tieren wurden gemischt und zu gleichen Teilen mit Glycerin versetzt. Aufbewahrung im Eisschrank von + 4—5° C.

Technik der Agglutination.

Zur Objektglas-Agglutination wurden lebende Agarkulturen benutzt, während zur Reagenzglas-Agglutination 0,5 % Formalinbouillon-Kulturen (20 std.), gelegentlich auch gekochte Bouillonkulturen (1 Stunde 100° C.) angewandt wurden. Die Reagenzglas-Agglutination wurde nach ca. 20 std. Aufenthalt im Wasserbade von 50° C. abgelesen. Als Titer wurden nur die mit blossen Auge erkennbaren Reaktionen gerechnet.

Technik der Absorption.

Zur Absorption der 1:20 verdünnten Immunseren wurden 1 Stunde im Dampftopf gekochte Aufschwemmungen von Agarplatten benutzt, die dann zentrifugiert wurden, sodass die Serumverdünnungen auf den Bodensatz der Gläser pipettiert wurden. Nach gutem Durchmischen kamen die Röhrechen 2 Stunden lang in den Brutschrank von 37° C. und dann bis zum nächsten Tage in den Eisschrank (+ 4–5° C.). Es wurde dann zentrifugiert und die Absorption nochmals in derselben Weise mit einer neuen Kultur wiederholt, sodass also sämtliche Seren 2 × absorbiert wurden.

Zur Absorption wurden enorme Bakterienmengen benutzt, um nur qualitative Differenzen festzustellen. Die hierzu benutzten Bakterienaufschwemmungen waren fast zähflüssig. Auf den Bodensatz der Zentrifugenröhrechen (etwa von der Weite eines gewöhnlichen Reagenzglases) wurde ca. dieselbe Raummenge der Serumverdünnung pipettiert und dann durchmischt.

Es sei besonders hervorgehoben, dass es sich bei dieser Technik absichtlich um eine aussergewöhnlich starke Absorption handelt, sodass hierdurch festgestellte Differenzen mit Sicherheit auf qualitative Antigenunterschiede zurückgeführt werden können, zumal die Absorptionen stets 2 ×, in mehreren Fällen sogar 4 × wiederholt wurden.

Über die Antigenanalyse der »Flexner«-Typen.

Da ich unter den vorliegenden Flexner-Kulturen 5 verschiedene serologische Typen feststellen konnte, so seien diese Typen im folgenden näher besprochen. Es handelt sich um die 3 deutschen Typen A, D und H sowie die beiden englischen Typen Mountain W X (mit W X abgekürzt) und Oxford W (mit W abgekürzt). Bei der Objektglas-Agglutination ergaben diese 5 Kulturen in den entsprechenden Immunseren folgende Titer, die in der Tabelle 1 dargestellt sind:

Tabelle 1.

Ergebnisse der Objektglas-Agglutination mit nicht absorbierten Immunsereu.

Kulturen	Immunsereu				
	A	D	H	WX	W
A	80	20	40	40	80
D	5	80	(5)	80	40
H	80	10	80	80	10
WX	5	40	5	80	5
W	40	40	20	40	80

Zeichenerklärung: Die Zahlen geben die Titer an, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Seren zu gleichen Teilen mit Glycerin versetzt sind, sodass die ursprünglichen Titer doppelt so hoch liegen. Die Titerzahlen entsprechen einer mit blossen Auge ablesbaren Agglutination, mit Ausnahme einer einzigen Reaktion (5), die nur bei Lupenablesung (6fach) erkennbar war.

Man sieht aus der Tabelle 1, dass man bereits mit Hilfe unabsorbierter Seren in der Objektglas-Agglutination deutliche Unterschiede feststellen kann; doch bleibt zu berücksichtigen, dass diese Zahlen sich nur auf die von mir benutzten Seren beziehen, da beim Gebrauch anderer Seren Abweichungen vorkommen können. Die Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination sind in der Tabelle 2 zusammengestellt und bestätigen im grossen und ganzen die Resultate der Objektglas-Agglutination.

Zur Klärung der Antigenstruktur dieser 5 Typen A, D, H, WX und W wurde eine Reihe von Absorptionsversuchen ausgeführt, von denen in den Tabellen 3 und 4 die wichtigsten zusammengestellt sind. Beim Vergleich dieser beiden Tabellen ersieht man, dass man in einigen Fällen bei der Objektglas-Agglutination negative Resultate erhält, während die Reagenzglas-Agglutination eine schwache Agglutination aufweist. Zur Typendiagnose mit Hilfe der Objektglas-Agglutination eignen sich also nur bestimmte Seren, auf die wir sogleich näher eingehen werden. Will man die Resultate der Absorp-

Tabelle 2.

Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination mit nicht absorbierten Immunsereen.

Kulturen	Immunsereen				
	A	D	H	WX	W
A	10240	1280	1280	640	5120
D	160	10240	40	2560	640
H	1280	160	2560	1280	80
WX	40	5120	640	10240	160
W	2560	640	640	640	2560

Zeichenerklärung: Die Titerzahlen entsprechen einer mit blossem Auge ablesbaren Agglutination.

tionsversuche — unter Berücksichtigung der Reagenzglas-Agglutination (Tabelle 4) — formelmässig darstellen, so ergeben sich folgende Antigenformeln:

Flexner	A = 1, 2, 4, 5, 7
»	D = 1, 3, 5, 8
»	H = 1, 2, 4, 6
»	WX = 1, 3, 4, 6
»	W = 1, 4, 5, 7

Die Zahlen 1—8 dieser Antigenformeln haben keinerlei Beziehung zu den entsprechenden Zahlen der Salmonella-Antigenformeln.

Mit Hilfe dieser Formeln lassen sich fast alle Absorptionsergebnisse erklären; doch kommen folgende Ausnahmen vor: Das mit der Kultur D absorbierte Serum A agglutiniert nicht die Kultur WX, obwohl das 4-Agglutinin im absorbierten Serum enthalten ist. Da jedoch bereits das unabsorbierte A-Serum die Kultur WX nur bis 1:40 agglutiniert, so ist auf diese negative Reaktion kein besonderer Wert zu legen. Ferner wurde die Mountain WX-Kultur nicht vom H-Serum, das mit der A-Kultur absorbiert war, agglutiniert. Ausserdem blieb eine

Tabelle 3.
Ergebnisse der Objektglas-Agglutination mit absorbierten Immunsere.

Immunsere																						
Kulturen	A					D					H			WX				W				
	absorbiert mit					absorbiert mit					nicht ab- sorbiert	absorbiert mit			nicht ab- sorbiert	absorbiert mit			nicht ab- sorbiert	absorbiert mit		
	nicht ab- sorbiert	absorbiert mit				nicht ab- sorbiert	absorbiert mit					nicht ab- sorbiert	absorbiert mit			nicht ab- sorbiert	absorbiert mit					
		D	H	WX	W		D+H	A	H	WX			W	WX+W			A	D		WX	W	A
	A	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
D	±	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
H	++	++	++	++	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WX	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

des Obiektglas-Agglutination; ++ und + = mit blosssem Auge

Zeichenerklärung: ++, + oder ± = verschiedene Stärke der Objektglas-Agglutination; ++ und + = mit bloßem Auge erkennbar; ± = nur mit der Lupe (6(fach) erkennbar. — = negativ.

Die Absorption mit den homologen Kulturen führte zu völliger Erschöpfung der Sere. Die nicht absorbierten Sere wurden in einer Verdünnung von 1:10, die absorbierten in einer Verdünnung von 1:20 angewandt.

Tabelle 4.
Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination mit absorbierten Immunsereen.

Immunsereen																											
Kulturen	A					D					H					WX					W						
	nicht ab- sorbiert	absorbiert mit				nicht ab- sorbiert	absorbiert mit				nicht ab- sorbiert	absorbiert mit				nicht ab- sorbiert	absorbiert mit				nicht ab- sorbiert	absorbiert mit					
		D	H	WX	W		D+H	A	H	WX		W	WX+W	A	D		WX	W	A	D		H	W	A	D	H	W
A	10240	5120	1280	5120	2560	1280	0	640	640	0	1280	0	640	1280	640	640	0	160	0	5120	0	1280	2560	2560			
D	160	0	80	80	0	10240	2560	5120	1280	2560	40	0	0	0	2560	1280	0	1280	1280	640	0	0	320	320			
H	1280	640	0	1280	1280	160	0	0	0	0	2560	80	1280	2560	1280	1280	640	640	0	640	80	0	0	0			
WX	40	0	0	0	0	5120	2560	2560	0	1280	640	80	160	0	80	10240	5120	2560	2560	160	0	40	0	0			
W	2560	1280	1280	1280	0	640	0	640	320	0	640	0	40	160	0	640	0	160	0	2560	0	2560	2560	2560			

Zeichenerklärung: Die Zahlen geben die Titer an (mit bloßem Auge abgelesen). 0 = negativ bei 1:40.
Die Absorption mit den homologen Kulturen führte zu völliger Erschöpfung der Sereen.

schwach positive Agglutination der W-Kultur im H-Serum, das mit der Kultur WX absorbiert war, unberücksichtigt.

Man ersieht aus den Formeln, dass die Oxford W-Kultur der A-Kultur sehr nahe steht und sich von ihr nur durch das Fehlen des 2-Antigens unterscheidet, sodass es sich hierbei um eine Verlustvariante handeln könnte. Es bestehen jedenfalls nähere Beziehungen der W-Kultur zur A-Kultur als zur WX-Kultur, sodass aus der ähnlichen Benennung (W—WX) keine Rückschlüsse auf eine besonders nahe serologische Verwandtschaft zu ziehen sind.

Über die praktische Diagnose der serologischen »Flexner«-Typen.

Nachdem wir durch die oben wiedergegebenen Absorptionsversuche über die Antigenstruktur der 5 untersuchten Dysenterie-Typen Klarheit gewonnen haben, wollen wir diejenigen Faktoren-Seren auswählen, mit deren Hilfe eine praktisch brauchbare Differentialdiagnose möglich ist. Für diesen Zweck eignen sich z. B. folgende Seren: 2-Serum = Serum A (1, 2, 4, 5, 7) absorbiert mit der Kultur W (1, 4, 5, 7). 3,8-Serum = Serum D (1, 3, 5, 8) absorbiert mit der Kultur A (1, 2, 4, 5, 7). 5,8-Serum = Serum D (1, 3, 5, 8) absorbiert mit der Kultur WX (1, 3, 4, 6).

Wie man mit Hilfe dieser 3 Seren die Differentialdiagnose zwischen den 5 verschiedenen Typen stellen kann, geht aus der Tabelle 5 hervor.

Man ersieht aus der Tabelle 5, dass man allein mit Hilfe der Objektglas-Agglutination, also in wenigen Minuten, die Typen-Differentialdiagnose stellen kann, sofern man über die notwendigen Seren verfügt. Wie es aus den Tabellen 3 und 4 hervorgeht, eignen sich zur Differentialdiagnose auch andere Faktoren-Seren als die 3 oben genannten, sodass es dem Belieben des Untersuchers überlassen bleibt, welche Seren er wählen will. Die serologische Typendiagnose in der Dysenterie-Gruppe ist ein so einfaches und sicheres Verfahren, dass es in jedem bakteriologischen Laboratorium durchführbar ist.

Tabelle 5.
Typen-Differentialdiagnose mit Hilfe absorbierter Seren.

Typen-Differentialdiagnose									
Kultur	Antigen- formel	Faktoren-Seren						D+H unab- sorbiert	
		2		3,8		5,8			
		O	R	O	R	O	R	O	R
A	1, 2, 4, 5, 7	++	2560	—	0	+	640	++	1280
D	1, 3, 5, 8	—	0	++	2560	++	1280	++	5120
H	1, 2, 4, 6	++	1280	—	0	—	0	++	2560
WX	1, 3, 4, 6	—	0	++	2560	—	0	++	2560
W	1, 4, 5, 7	—	0	—	0	+	320	++	1280

Zeichenerklärung: O = Objektglas-Agglutination. R = Reagenzglas-Agglutination. D + H unabsorbiert = unabsorbiertes, polyvalentes D + H-Serum, durch gleichzeitige Immunisierung von Kaninchen mit den Kulturen D 118 + H 39 gewonnen.

In jedem Falle würde es schon einen wesentlichen Fortschritt bedeuten, wenn überall die Differentialdiagnose zwischen den Typen A, D und H gestellt würde. Wie es aus der Tabelle 5 hervorgeht, genügen hierfür 3 absorbierete Seren, die in der Objektglas-Agglutination anwendbar sind und folgende Resultate ergeben:

Kultur	Faktoren-Seren		
	2	3,8	5,8
A	++	—	+
D	—	++	++
H	++	—	—

Zur allgemeinen Diagnose »Flexner-Gruppe« ist dagegen ein polyvalentes Serum erforderlich, das man z. B. durch gleichzeitige Immunisierung von Kaninchen mit den Typen D + H (oder A + D + H) herstellt. Man kann zu diesem Zwecke auch das sehr übergreifende Serum Mountain WX be-

nutzen, das in der Objektglas-Agglutination (1:10 verdünnt) alle von mir untersuchten Flexner-Stämme agglutinierte.

In Bestätigung der Literaturangaben, z. B. der Befunde von *D. Kalic*, von *F. Sartorius* und *H. Reploh*, von *K. W. Clauberg* u. a., sind die Kulturen A 531 und Stansfield V Z auf Grund gekreuzter Absorptionsversuche identisch, ebenso die Kulturen H 39 und Whittington Z, sodass also die Typen-Bezeichnungen V Z und Z fallen zu lassen sind. Die Kultur »Hiss-Russell Y« gehört zum D-Typ, da sie imstande ist, das D-Serum völlig zu erschöpfen. Doch gelang es mir andererseits nicht, das Hiss-Russell Y-Serum restlos mit dem Stamme D 118 zu erschöpfen, sodass hier wahrscheinlich eine Verlustvariante des D 118-Stammes vorliegt. In den oben wiedergegebenen Absorptionsversuchen (Tabelle 3 und 4) verhielt sich der Stamm Hiss-Russell Y genau so wie der Stamm D 118. Auch in der Literatur wird einer der alten »Y«-Stämme von *Hiss-Russell* zum D-Typ gerechnet, wie es z. B. aus der Darstellung von *A. D. Gardner* hervorgeht.

In Übereinstimmung mit der Literatur gehören die »Schmitz«-Kulturen zum I-Typ und die »Sonne«-Kulturen zum E-Typ, sodass die Bezeichnungen dieser Typen ebenfalls den originalen Bezeichnungen von *Kruse* zu entsprechen haben.

Wie man sieht, besteht also zwischen allen serologischen Arbeiten der letzten Zeit eine sehr weitgehende Übereinstimmung, sodass die Serologie der Dysenterie-Gruppe prinzipiell als gelöst betrachtet werden muss. Weitere Untersuchungen sind vor allem über den Formenwechsel notwendig, dem wir uns nun zuwenden wollen.

Über den serologischen Formenwechsel in der Dysenterie-Flexner-Gruppe.

Wie schon oben erwähnt, fand ich bei orientierenden Untersuchungen über den Formenwechsel innerhalb der Glattformen (der Rauh-Formenwechsel bleibt hier ausser Betracht) eine Verlustvariante der A 531-Kultur, der das auf *S. senftenberg* übergreifende Antigen fehlte. Während die normalen A

531-Kolonien in einem sehr starken S. senftenberg O-Serum (I-Titer 1:2560) eine prompte und kräftige Objektglas-Agglutination ergaben, wurden einige Kolonien gefunden, die in diesem Serum negativ reagierten. Bei Fortzüchtung von je einer positiven und je einer negativen Kolonie (mit plus-Form resp. minus-Form bezeichnet) blieben alle Nachkommen dieser Kolonien konstant. Eine Abspaltung der anderen Form konnte bisher nicht festgestellt werden, obwohl diese Kulturen monatelang verfolgt wurden und sehr zahlreiche Einzelkolonien in der Objektglas-Agglutination geprüft wurden. Man kann daher annehmen — sofern es sich nicht um eine Mischkultur von 2 verschiedenen Typen handelt —, dass in der Kultur A 531 zu einem unbestimmten Zeitpunkt eine Verlustvariante aufgetreten ist, die konstant blieb. Da diese Variante sonst alle für den A-Typ charakteristischen Partialantigene enthielt, so kann man einen genetischen Zusammenhang annehmen, obwohl zwischen beiden Stämmen kulturelle Unterschiede bestehen (siehe weiter unten).

Eine Verlustvariante wurde ferner bei der Kultur Mountain WX bei Untersuchung einzelner Kolonien festgestellt; doch handelte es sich hierbei um einen Formenwechsel, da beide Formen, die plus-Form und die minus-Form, wechselseitig einander abspalteten, wobei jedoch die plus-Form erheblich stabiler war als die minus-Form. Die Besonderheit der minus-Form bestand darin, dass nicht nur das auf S. senftenberg übergreifende Antigen verloren gegangen war, sondern auch ein grosser Teil der normalen Dysenterie-Antigene dieses Typus WX. Während die erste Untersuchung der Original-Kultur 3 Kolonien der plus-Form und 7 Kolonien der minus-Form ergab, zeigten weitere Passagen von je einer einzigen Kolonie beider Formen eine Abspaltung, die in der Tabelle 6 wiedergegeben ist.

Während also von 110 Kolonien der plus-Form nur 2 Kolonien der minus-Form angehörten, waren von 240 Kolonien der minus-Form 41 Kolonien plus-Formen und 199 Kolonien minus-Formen. Die Mountain plus-Form wurde vom D-Serum bis 1:5120 agglutiniert, die minus-Form dagegen nur bis 1:40,

Tabelle 6.
*Abspaltung der plus- und minus-Formen beim Stamme
 Mountain WX.*

plus-Form	plus	minus	minus-Form	plus	minus
1. Passage	18	2	1. Passage	3	17
2. „	10	0	2. „	0	10
3. „	10	0	3. „	6	14
4. „	10	0	4. „	9	41
5. „	10	0	5. „	12	48
6. „	10	0	6. „	4	6
7. „	10	0	7. „	1	9
8. „	10	0	8. „	2	8
9. „	10	0	9. „	0	20
10. „	10	0	10. „	4	26
Gesamt	108	2	Gesamt	41	199

Zeichenerklärung: Bei Fortzüchtung von 1 Kolonie waren z. B. 18 Kolonien plus-Formen und 2 Kolonien minus-Formen.

da ihr das 3-Antigen fehlte. Dieses ging aus einem der obigen Absorptionsversuche hervor, da nämlich das mit der H-Kultur absorbierte Mountain Serum, das nur noch das 3-Agglutinin enthielt, die Mountain minus-Form nicht agglutinierte, die plus-Form dagegen bis 1:2560.

Ein mit der Mountain minus-Form hergestelltes Immuns-
 serum konnte durch die plus-Form nicht vollständig für die
 minus-Form erschöpft werden. Das Entsprechende war auch
 bei einem Serum der A 531 minus-Form der Fall, das durch
 die A 531 plus-Form nicht restlos erschöpft werden konnte.
 Umgekehrt konnte die A 531 minus-Form das Serum der A
 531 plus-Form nicht erschöpfen, da noch Agglutinine für A
 und W im Serum zurückblieben. Das Serum der Mountain
 plus-Form wurde dagegen von der Mountain minus-Form rest-
 los erschöpft, weil es wegen des stark ausgeprägten Formen-

49502

wechsels nicht möglich war, die minus-Form rein zu erhalten.

Ich will hier absichtlich nicht auf weitere Einzelheiten eingehen, obwohl ich noch über mehrere Absorptionsversuche verfüge, da diese Untersuchungen über den Formenwechsel der Dysenterie-Bakterien auf eine erheblich breitere Basis gestellt werden müssten, um einen klaren Einblick in die Antigenveränderungen innerhalb der Glatt-Formen zu gewinnen.

Über die Antigenbeziehungen der Dysenterie-Flexner-Gruppe zur Salmonella-Gruppe.

Auf Antigenbeziehungen zwischen Kulturen der Flexner-Gruppe und Salmonella-Kulturen wurde ich durch positive Objektglas-Agglutinationen gelenkt, die ich mit einem starken S. senftenberg O-Serum (Nr. 84) in der Verdünnung 1:5 erhielt. Während die A-, D-, WX- und W-Kulturen von diesem Serum agglutiniert wurden, blieben die H-Kulturen hiervon unbeeinflusst, und zwar auch frisch isolierte H-Kulturen, im Gegensatz zu frisch isolierten D-Kulturen. Wie schon erwähnt, konnten aus den Kulturen A 531 und Mountain WX Kolonien isoliert werden, die vom Senftenberg-Serum nicht agglutiniert wurden. Zur Erzielung einer positiven Objektglas-Agglutination von Dysenterie-Kulturen ist es jedoch nötig, ein sehr starkes Senftenberg-Serum zu benutzen; so ist z. B. das Senftenberg-Testserum der internationalen Salmonella-Centrale (Serie 1) für diesen Zweck ungeeignet. In der Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination mit diesen beiden Seren (Serie 1 und Nr. 84) enthalten, aus denen hervorgeht, dass beide Seren deutliche Titerunterschiede aufweisen. Für Absorptionsversuche mit Flexner-Kulturen ist daher nur das Serum Nr. 84 geeignet.

Bei Anwendung von Flexner-Seren und Salmonella-Kulturen (Alcohol-Suspension) in der Reagenzglas-Agglutination wurden nur niedrige Agglutinationstiter erzielt, die zu dem hohen Flexner-Titer dieser Seren in keinem Verhältnis stehen (siehe Tabelle 8). Vor allem wurden diejenigen Salmonella-Kulturen agglutiniert, die das I-Antigen enthalten sowie einige

Tabelle 7.

Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination in *Salmonella* O-Seren.

Salmonella-Seren	Dysenterie-Flexner-Kulturen					homologe Salmonella- Kultur
	A	D	H	WX	W	
I.II.XII...	40	0	0	0	40	640
IV.XII...	20	80	0	40	20	640
VI.VII...	(20)	(20)	(20)	20	(20)	640
VI.VIII...	20	40	0	(20)	40	640
IX.XII...	0	(20)	0	0	(20)	1280
III.X.XXVI.	0	0	0	0	0	640
I.III.XIX, Serie 1	40	40	0	20	40	640
I.III.XIX, Nr. 84	320	160	40	320	640	5120
XI.	0	20	(20)	0	20	1280
XIII.XXII.	80	20	0	40	80	640
I.XIII.XXIII.	160	20	0	40	160	640
VI.XIV.XXIV.	40	20	0	20	40	640
(I).VI.XIV.XXV.	80	40	0	40	80	640
XVII.	40	0	0	0	160	1280
(VIII).XX.	80	0	0	20	80	320
XXI.XXVI.	20	0	0	0	40	640
XXVIII.	40	80	0	40	20	320
XXIX.	40	0	0	0	40	5120
XXX.	80	0	0	0	40	640

Zeichenerklärung: 0 = negativ bei 1 : 10. (20) = schwach positiv, nur mit der Lupe sichtbar.

O-empfindliche Kulturen wie *S. typhi* und *S. carrau*. Um die Antigenbeziehungen der Flexner-Kulturen zu *S. senftenberg* und *S. paratyphi* A zu klären, wurden einige Absorptionsversuche mit dem Senftenberg-Serum (Nr. 84) ausgeführt, die in der Tabelle 9 dargestellt sind.

Tabelle 8.

Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination von *Salmonella*-Alcohol-Suspensionen in Dysenterie-Flexner-Seren.

Salmonella-Kulturen	Antigenformel	Dysenterie-Flexner-Seren				
		A	D	H	WX	W
<i>S. paratyphi</i> A	I.II.XII...	(20)	20	0	40	0
<i>S. »</i> var. durazzo	II.XII...	0	0	0	0	0
<i>S. paratyphi</i> B	IV.V.XII...	0	(20)	0	(20)	0
<i>S. essen</i> 173	IV.XII...	0	(20)	0	(20)	0
<i>S. bredeney</i>	I.IV.XXVII.XII...	20	40	(20)	80	(20)
<i>S. schleissheim</i>	IV.XXVII.XII...	0	0	0	0	0
<i>S. kunzendorf</i> 1350	VI ₁ .VII...	0	(20)	0	40	0
<i>S. »</i> 5210	VI ₂ .VII...	(20)	0	0	160	20
<i>S. thompson</i>	VI ₁ .VI ₂ .VII...	0	(20)	0	20	(20)
<i>S. newport</i>	VI ₁ .VIII...	(20)	40	0	20	0
<i>S. typhi</i> 901	IX.XII...	20	160	(20)	80	(20)
<i>S. enteritidis</i>	IX.XII...	0	0	0	0	0
<i>S. london</i>	III.X.XXVI.	0	0	0	0	0
<i>S. newington</i>	III.XV.	0	0	0	0	0
<i>S. senftenberg</i>	I.III.XIX.	80	80	0	160	40
<i>S. aberdeen</i>	XI.	0	0	0	40	0
<i>S. poona</i>	XIII.XXII.	0	0	0	20	0
<i>S. worthington</i>	I.XIII.XXIII.	40	40	0	160	40
<i>S. carrau</i>	VI.XIV.XXIV.	40	40	0	80	40
<i>S. onderstepoort</i>	(I).VI.XIV.XXV.	80	80	20	320	80
<i>S. hvittingfoss</i>	XVI.	0	0	0	0	0
<i>S. kirkee</i>	XVII.	0	20	0	20	0
<i>S. cerro</i>	XVIII.	0	0	0	0	0
<i>S. kentucky</i>	(VIII).XX.	(20)	(20)	0	20	20
<i>S. minnesota</i>	XXI.XXVI.	0	0	0	20	0
<i>S. tel-aviv</i>	XXVIII.	0	(40)	0	20	0
<i>S. ballerup</i>	XXIX.	20	20	(20)	20	(20)
<i>S. urbana</i>	XXX.	(20)	20	0	0	0
homologer Stamm		10240	10240	2560	10240	2560

Zeichenerklärung: 0 = negativ bei 1:20. (20) = schwach positiv, nur mit der Lupe sichtbar.

Tabelle 9.
Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination.

Kulturen	O-Serum von S. senftenberg				
	nicht absorbiert	absorbiert mit			
		S. paratyphi A	Flexner		
			A	D	A+D
*Flexner A	320	160	0	80	0
» D	160	40	80	0	0
» H	40	0	0	0	0
» WX	320	80	160	0	0
» W	640	320	0	80	0
S. paratyphi A	2560	0	1280	320	320
S. senftenberg	5120	2560	2560	1280	1280

Zeichenerklärung: 0 = negativ bei 1:20. Die zur Agglutination benutzten Flexner-Kulturen waren Formalin-Bouillonkulturen, die Salmonella-Kulturen dagegen Alcohol-Suspensionen.

Man ersieht aus der Tabelle 9, dass die Antigenbeziehungen der Flexner-Kulturen A, D, WX und W zu S. senftenberg nicht allein auf dem I-Antigen oder vielmehr auf Teilen des I-Antigens beruhen können, da nach Absorption mit S. paratyphi A noch deutliche Agglutinine für die Flexner-Kulturen zurückbleiben. Wir lassen hier die Flexner H-Kultur ausser Betracht, da sie vom nicht absorbierten Senftenberg-Serum nur schwach agglutiniert wird.

Absorbiert man nun das Senftenberg-Serum mit der Flexner A-Kultur, so bleiben noch Agglutinine für D und WX zurück, während nach Absorption mit der Flexner D-Kultur noch Agglutinine für A und W zurückbleiben. Erst durch kombinierte Absorption mit den Typen A + D gelingt es, alle auf Flexner-Kulturen übergreifende Senftenberg-Agglutinine zu entfernen.

Zwischen den Glattformen von Dysenterie E, I und Shiga einerseits und Salmonella-Kulturen andererseits konnte ich keine Antigenbeziehungen feststellen. Auch zwischen den Dysenterie E, I und Shiga-Kulturen einerseits und den Kulturen der Flexner-Gruppe andererseits bestehen keine Antigenbeziehungen, ebenso nicht zwischen den Dysenterie-Kulturen E, I und Shiga unter einander. Es geht hieraus — in Bestätigung der Literaturangaben — hervor, dass die Dysenterie-Flexner-Gruppe eine Sonderstellung einnimmt und im Sinne von Kruse aus mehreren serologischen Typen besteht.

Über das kulturelle Verhalten der Dysenterie-Kulturen.

Die kulturelle Untersuchung der oben erwähnten Dysenterie-Kulturen erfolgte mit Hilfe derselben Nährböden, die für die Salmonella-Gruppe gebraucht werden und in meinem Buche »Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe« angegeben sind. Die Resultate dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 10 zusammengestellt.

Alle Kulturen waren unbewegliche, gramnegative Stäbchen, die auf den üblichen Nährböden gut wuchsen; Bouillon wurde diffus getrübt. Die Gasbildung fehlte bei sämtlichen Kulturen. Mit Ausnahme der Stämme D 118, H 39 und Whittington Z waren alle Kulturen ammonschwach. Die Stämme D 118, H 39 und Whittington Z ergaben auf Simmons-Glucose eine positive Reaktion nach 1—2 Tagen und auf Simmons-Arabinose nach 2—8 Tagen. Auf den übrigen Simmons-Nährböden waren die Reaktionen negativ. Alle frisch isolierten Dysenterie-Kulturen waren völlig ammonschwach, sodass die soeben citierten positiven Reaktionen wahrscheinlich Alterserscheinungen sind. Die Reaktionen in den Lösungen nach Bitter, Weigmann und Habs mit Arabinose, Dulcit, Glucose, Rhamnose und Xylose waren negativ.

Die hier geprüften Kulturen sind bereits vor ca. 10 Jahren im hiesigen Institute vergärungsmässig durch K. Bojlén untersucht worden, der die umfangreichste kulturelle Dysenterie-Untersuchung, die in der Literatur vorliegt, ausgeführt hat.

Tabelle 10.
Kulturelles Verhalten der Dysenterie-Kulturen.

	Flexner-Gruppe												
	A		D		H		W	WX	X	E 65	I		Shi
	531	VZ	118	Y	39	Z					471	Schmitz	
Adonit, Dulcit, Inosit, Xylose	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀
Glucose, Trehalose	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Arabinose	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Dextrin	+ ¹	+ ¹	+ ¹	— ₃₀	+ ¹	+ ¹	+ ¹	— ₃₀	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Lactose	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀
Maltose	+ ¹	+ ¹	+ ¹	— ₃₀	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Mannit	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Rhamnose	— ₃₀	— ₃₀	+ ¹	— ₃₀	+ ¹	+ ¹	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Saccharose	+ ¹	+ ¹	— ₃₀	— ₃₀	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Salicin	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀
Sorbit	— ₃₀	— ₃₀	+ ¹	— ₃₀	+ ¹	+ ¹	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—
H ₂ S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gelatine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Stern Glycerin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
d-Tartrat	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄
l-Tartrat, i-Tartrat, Na-Citrat	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄
Mukat	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄	— ₁₄
Simmons- Glucose	— _R	— _R	+ ¹	— _R	+ ¹	+ ¹	— _R	— _R	— _R	— _R	— _R	— _R	— _R

Zeichenerklärung: VZ = Stansfield VZ, Y = Hiss-Russell Y. Z = Whittington Z, W = Oxford W, WX = Mountain WX, X = Hughes X.
—₃₀ = negativ nach 30 Tagen. +¹ = positiv nach 1 Tage. —¹₂ = negativ nach 1 Tage, positiv nach 2 Tagen.

Seine Befunde entsprechen prinzipiell den meinen, sodass hierdurch die weitgehende Konstanz der betreffenden Reaktionen hervorgeht. Da ich selbst jedoch nur ein sehr kleines Material untersucht habe, so will ich nicht näher auf die Frage der Vergärungstypen eingehen, sondern nur einige Punkte hervorheben.

Innerhalb der Flexner-Gruppe scheint besonders die *Saccharose* von diagnostischer Bedeutung zu sein, da der D-Typ diese Substanz nicht spaltet, im Gegensatz zu den übrigen Typen, die Saccharose verzögert nach einigen Tagen vergären. Dieses wurde bereits wiederholt in der Literatur festgestellt, so z. B. von *Sartorius* und *Replow*, welche ausserdem den diagnostischen Wert der Bacteriophagen-Reaktion betonten. Auch das *Sorbit* scheint für die Aufstellung von Vergärungstypen brauchbar zu sein, worauf bereits *Bojlen* hinwies. Dagegen sind die *Maltose*-Reaktionen unzuverlässig; wie es auch aus der Literatur hervorgeht, sodass die alte Einteilung in »Y« und »Flexner« auf Grund der Maltosevergärung unhaltbar ist. Dasselbe gilt für die Dextrin-Reaktion, die der Maltose-Reaktion parallel läuft. Dagegen ist die Bedeutung der *Mannit*-Reaktion zur Abtrennung der I- und Shiga-Typen über jeden Zweifel erhaben und praktisch wichtig, obwohl man diese Diagnosen auch sehr leicht serologisch stellen kann.

Von den *organischen Säuren* ermöglicht das d-Tartrat die Absonderung des I-Typus, während das Mukat die E-Kulturen aus den anderen Typen heraushebt. Während der originale Stamm E 65 von *Kruse* Mukat prompt spaltete, vergärten die übrigen frisch isolierten E-Kulturen das Mukat verzögert nach mehreren Tagen.

Über das kulturelle Verhalten der beiden serologischen Varianten von A 531 und Mountain WX sei noch folgendes gesagt: Während die A 531 plus-Form Maltose prompt spaltete und kein Indol bildete, griff die minus-Form Maltose spät und unregelmässig an (zuweilen überhaupt nicht) und bildete prompt Indol. Es lässt sich daher nicht mit Sicherheit ausschliessen, dass hier eine Mischkultur von 2 verschiedenen Typen vorliegt; doch halte ich das Auftreten einer serologi-

schen Verlustvariante, die sich auch kulturell abweichend verhält, für wahrscheinlicher. Die Mountain WX minus-Form unterscheidet sich kulturell nur dadurch von der plus-Form, dass sie Maltose langsamer als die plus-Form spaltete. Während nämlich die plus-Form Maltose nach ca. 1 Woche angriff, tat dieses die minus-Form erst nach 2—3 Wochen. Beide Formen bildeten Indol. Bei der Untersuchung dieser 4 Formen wurden nicht nur die Massenkulturen, sondern auch zahlreiche Einzelkolonien untersucht.

Betreffs weiterer Vergärungstypen innerhalb der Dysenteriegruppe (speziell der Flexner- und E-Gruppe) sei auf die Monographie von *K. Bojlén »Dysentery in Denmark«* sowie auf die Darstellung von *O. Lentz* und *R. Prigge* verwiesen.

Besprechung der Ergebnisse.

Als Hauptergebnis der vorliegenden Untersuchungen betrachte ich die Feststellung, dass zwischen den einzelnen Flexner-Typen deutliche *qualitative* Antigendifferenzen bestehen, sodass mit ihrer Hilfe eine scharfe Typentrennung möglich ist. Gewiss kommen auch *quantitative* Antigendifferenzen (im Sinne von *F. W. Andrewes* und *A. C. Inman*) bei den einzelnen Kulturen zum Ausdruck, doch spielen sie bei geeigneter Versuchstechnik keine praktische Rolle und stören die Typenbestimmung nicht. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit den Angaben von *F. Sartorius* und *H. Reploh* sowie von *K. W. Clauberg*, welche die serologische Typendiagnose mit Hilfe absorbiert Seren durchführten. Im einzelnen entsprechen meine Absorptions-Ergebnisse mit den Typen A, D und H völlig den Befunden von *Clauberg*, sodass hieraus gleichzeitig hervorgeht, wie konstant diese Typen sind und wie gleichmässig die mit ihnen hergestellten Seren ausfallen. Der von *Clauberg* untersuchte »Flexner«-Stamm stand mir nicht zur Verfügung und ist auf Grund der Protokolle von *Clauberg* als selbständiger serologischer Typus zu betrachten. Wie es aus den eingehenden Arbeiten von *Sartorius* und *Reploh* sowie aus verschiedenen japanischen Arbeiten her-

vorgeht, kommen weitere serologische Typen in Betracht, so dass unter ihrer Berücksichtigung das oben angegebene Antigen-schema erweitert werden müsste. Da aber wahrscheinlich in bestimmten Gegenden der Erde nur einige dieser Typen vorkommen (in Dänemark scheint es sich hauptsächlich um die Typen D und H zu handeln), so braucht man in der täglichen Praxis nur diese Typen zu berücksichtigen, kann also mit wenigen absorbierten Seren auskommen. Auf die Bedeutung des Absorptionsversuches, den bereits *Kruse* und Mitarbeiter anwandten, hat auch *H. S. Gettings* hingewiesen.

Ich will keine starren Regeln für die serologische Typenbestimmung vorschlagen, sondern nur betonen, dass zwischen den einzelnen Dysenterie-Typen konstante *qualitative* Antigen-differenzen bestehen, sodass man mit Hilfe von Faktoren-Seren ohne Schwierigkeiten Typendiagnosen stellen kann.

Es ist klar und geht auch aus den Versuchen von *Clauberg* hervor, dass die serologisch verschiedenen Flexner-Typen bei der *Widal-Reaktion* zu berücksichtigen sind, wenn man optimale Resultate erzielen will. Es ist aus der Tabelle 2 ersichtlich, dass man z. B. nicht erwarten kann, eine positive Widal-Reaktion zu erhalten, wenn man beim Vorliegen einer H-Infektion zum Widal eine D-Kultur anwendet oder umgekehrt. In Unkenntnis des betreffenden Typus erscheint es am besten, die Widal-Reaktion mit den Stämmen A, D und H getrennt anzusetzen, jedoch mindestens mit den Stämmen A und D oder D und H, worauf bereits *E. Boecker* und *F. Kauffmann* hinwiesen.

Das entsprechende muss auch für die Herstellung von *Vaccinen* gelten, da man eine optimale antibakterielle Wirkung nur bei Anwendung polyvalenter Vaccinen, die sämtliche in Betracht kommenden Antigene enthalten, erwarten kann (die Toxin-Frage bleibt hier ausser Betracht).

Über den serologischen Formenwechsel innerhalb der Dysenterie-Grattformen muss weiter gearbeitet werden, da die bisherigen orientierenden Versuche gezeigt haben, dass mit einem solchen Formenwechsel sowie mit dem Auftreten von Verlustvarianten zu rechnen ist.

Es besteht kein Zweifel, dass — genau so wie in der Salmonella-Gruppe — nur die konsequente Durchführung *serologischer* Untersuchungen die Differentialdiagnose innerhalb der Flexner-Gruppe klarstellen und hierdurch die »geradezu grenzenlose Verwirrung«, von der *Lentz* und *Prigge* sprachen, beseitigen kann. Die weitere Aufteilung der Serotypen, die durch qualitativ verschiedene Partialantigene charakterisiert sind, in Vergärungstypen muss mit Hilfe flüssiger Differentialnährböden, wie sie in der Salmonella-Gruppe angewandt werden, erfolgen. Erst dann wird man die Grundlage für exakte epidemiologische Dysenterie-Untersuchungen haben.

Die zuerst von *Kruse* durchgeführte Einteilung der Dysenterie-Gruppe in verschiedene serologische Typen besteht also zu Recht und wird durch die vorliegenden Untersuchungen prinzipiell bestätigt.

Zusammenfassung.

1) Von Antigenbeziehungen zwischen der Dysenterie- und Salmonella-Gruppe ausgehend, wurden serologische Untersuchungen speziell innerhalb der »Flexner-Gruppe« durchgeführt, um zu einer *praktisch brauchbaren Typendiagnose* zu gelangen. Dieses Ziel konnte erreicht werden, da zwischen den einzelnen Typen (A, D, H, W und WX) deutliche *qualitative* Antigendifferenzen festgestellt wurden. Mit Hilfe bestimmter Faktoren-Seren war die Typenbestimmung schon in der Objektglas-Agglutination möglich.

2) Es wurde festgestellt, dass die Kulturen Stansfield VZ zum A-Typ, Hiss-Russell Y zum D-Typ und Whittington Z zum H-Typ gehören. Dagegen stellen die Kulturen Mountain WX, Oxford W und wahrscheinlich auch Hughes X weitere selbständige Typen der Flexner-Gruppe dar.

3 Zwischen den einzelnen Typen der Flexner-Gruppe einerseits und den Typen I (= Schmitz), E (= Sonne) und Shiga andererseits bestehen unter Berücksichtigung der Glattformen *keine* Antigenbeziehungen.

4) Die Antigenbeziehungen zwischen der Dysenterie Flex-

ner- und Salmonella-Gruppe spielen praktisch keine Rolle und treten nur dann in Erscheinung, wenn man mit sehr starken Salmonella O-Seren (z. B. von *S. senftenberg*) arbeitet.

5) Innerhalb der Dysenterie-GLattformen kommt ein *Formenwechsel* vor, der einer näheren Untersuchung bedarf; ferner können *Verlustvarianten* auftreten.

6) Die Typeneinteilung in der Dysenterie-Gruppe muss — ebenso wie in der Salmonella-Gruppe — in erster Linie auf *serologischen Methoden* beruhen, sodass die weitere Unterteilung der *Serotypen* in *Vergärungstypen* mit Hilfe *kultureller Methoden* ein sekundärer Vorgang ist. Die serologischen Dysenterie-Typen sind praktisch als *konstant* zu betrachten und haben daher *epidemiologische* Bedeutung.

7) Die serologischen Dysenterie-Typen müssen sowohl bei der *Widal-Reaktion* als auch bei der *Vaccine-Herstellung* berücksichtigt werden.

LITERATUR.

- Andrewes, F. W. und A. C. Inman: Med. Research Committee. Spec. Rep. Ser. No. 42, 1919.
 Aoki, K.: Tohoku J. Exp. Med. 2, 142, 1921.
 — Tohoku J. Exp. Med. 4, 12, 1923.
 Boccker, E. und F. Kauffmann: »Bakteriologische Diagnostik«, bei J. Springer, Berlin 1931.
 Bojlén, K.: »Dysentery in Denmark«, Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S, Kopenhagen 1934.
 Clauberg, K. W.: Z. Bakt. 124, 23, 1932.
 — Z. Bakt. 128, 269, 1933.
 Gardner, A. D.: A System of Bacteriology 4, 220, 1929.
 Gettings, H. S.: Med. Research Committee. Spec. Rep. Ser. No. 30, 1919.
 Kalic, D.: J. Path. a. Bact. 30, 593, 1927.
 Kan, W.: Klin. Woch. 1936, II, 967.
 Kauffmann, F.: »Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe«, bei E. Munksgaard, Kopenhagen 1941.
 Kruse, W.: Veröff. Geb. Med. Verwalt. 1912, I, Heft 8.
 — Rittershaus, Kemp und Metz: Z. Hyg. 57, 417, 1907.

Lentz, O. und R. Prigge: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle, Kraus und Uhlenhuth 3, 1377, 1931.

Murakami, K.: Z. Immunf. 61, 486, 1929.

Nagakura, K.: Z. Immunf. 90, 139, 1937.

Sartorius, F.: Z. Bakt. 111, 266, 1929.

— *Z. Immunf. 74, 313, 1932.*

— und *H. Reploh: Z. Bakt. 122, 135*, 1931.*

— — *Z. Bakt. 126, 10, 1932.*

— — *Klin. Woch. 1931, II, 2216.*

DEPOSITION OF METHYLCHOLANTHRENE IN SOME ORGANS OF THE RAT.*)

By Ole Esmarch, M.D.

(Received for publication May 12th, 1941).

The first attempts to produce malignant tumors in the skin by repeated applications of coal tar were made on rabbits (Yamagiva and Ichikawa, 1916). Shortly after, it was shown that similar tumors could, with the same technic, be produced in an animal as readily procurable as the mouse (Tsutsui, 1918). Also on rats, numerous experiments have been made with the same object in view (see Woglom, 1926 and Seelig and Cooper, 1933), but most of them with negative result. Only a few reports exist of successful attempts to produce carcinoma at the point of application in rats that had not under any form been treated with other substances than tar (Guilera, Roca and Corachan, 1930; McEuen, 1939). The same difficulties are encountered when such experiments are made on rats with hydrocarbons that have a carcinogenic effect on mice. Long experiments, in which the rats were painted either with 3:4-benzpyrene (Oberling, Sannié, Guérin and Guérin, 1936) or with methylcholanthrene dissolved in benzol (Bachmann, Cook, Dansi, De Worms, Haslewood, Hewell and Robinson, 1937), did not result in any certain production of malignant tumors.

*) Towards the expenses of this research grants were made by the Danish National Anti-Cancer League and the Anders Hasselbalch Foundation.

In an experiment by *Russels* (1922), in which a number of rats were given weekly subcutaneous injections of 10 to 15 mgs. of tar, a polymorphocellular sarcoma developed in one of the animals after a latency period of 11½ months, with metastases to the lungs. The experiment originally comprised 40 rats, but only 4 of them lived so long that there could be any expectation of tumor development. That transplantable, invasively growing spindle cell tumors could arise at the point of injection in rats which at intervals of 2 to 4 weeks had been given injections of 2 to 4 mgs. of 1:2:5:6-dibenzanthrene dissolved in 2 to 3 c. c. of fat was shown by *Burrows*, *Hieger* and *Kennaway* (1932). Sixty-seven rats were used in the investigation, and 45 of these were still alive 3 months after the beginning of the experiment. Between the 137th and the 269th day, — on the average after 210 days, — tumors were found in 15 animals, in two of them with metastases to a regional lymph node or to the peritoneum. The experiment of these three investigators was, with the use of the same technic, successfully repeated by several others, for instance by *Maisin* and *Coolen* (1934) and *Behrenblum* and *Kendal* (1934), and the observations were confirmed also when other carcinogenic hydrocarbons were used, such as 3:4-benzpyrene (*Maisin* and *Coolen*, 1934; *Rondoni*, 1938; et al.) or methyleholanthrene (*Barry*, *Cook*, *Haslewood*, *Hewett*, *Hieger* and *Kennaway*, 1935; et al.).

The tumors are in most cases described as spindlecelled or polymorphocellular sarcomas. By thorough histologic examinations, growths have been found which in parts or throughout were either endotheliomas, osteoid sarcomas, lipo-, fibro-, leiomyo- or rhabdomyosarcomas; and in a few, rare cases squamous epitheliomas developed in connexion with the sarcoma formation (*Haagensen* and *Krehbiel*, 1936; *Ball* and *Samuels*, 1936; *Dunning*, *Curtis* and *Bullock*, 1936).

Experiments in which tar or carcinogenic hydrocarbons were brought in direct contact with other tissues or organs of rats have hitherto been rather few. Perhaps the difficulty of producing malignant tumors by application of the sub-

stances to the skin of these animals has led to the conclusion that the species did not lend itself well to experiments of this kind, but the fully established fact that sarcomas can be produced in rats by subcutaneous injection speaks against such an idea.

In experiments in which the substance is to be deposited in inner organs that have to be exposed beforehand by operative intervention it is preferable that the deposition should be made in a single injection, but only a few of the investigations so far have revealed the fact that subcutaneous sarcomas can be produced by a single injection of carcinogenic hydrocarbons dissolved in fat or paraffin (*Haagensen and Krehbiel, 1936; Brunschwig and Tschetter, 1937; Oberling, Guérin and Guérin, 1939 a*).

The present investigation has been made with the object of showing to what extent methylcholanthrene is capable of producing tumors in rats when deposited in various tissues or organs. To make sure that growth could, with the technic employed, be produced in a susceptible tissue, I first experimented with subcutaneous injection of the substance, and when these experiments had proved successful I tried the effect of deposition in mammary tissue, striated muscle, thyroid gland, peritoneum, liver, spleen, lung, uterus, testis and brain.

It is strange that no experiments have hitherto been made with introduction of carcinogenic hydrocarbons into the mammary tissue of rats, as this organ is quite as readily accessible as the subcutaneous tissue of any other region. Nor has deposition in the thyroid gland been tried before. With the other organs, experiments have been made to a greater or lesser extent, but mostly with varying results, probably owing to the widely different technics and dosages used. Respecting several of the organs, only single instances are reported in which growth had been produced.

With a material of 285 animals, *Klinke (1938)* has shown that the injection of a 1 per cent solution of 3:4-benzpyrene in a mixture of lard and oil into the thigh-muscles of rats

will produce sarcoma at the site of injection in a large percentage of these. Most of these sarcomas were of the spindle cell type. He found no tumors arisen from the parenchyma of the muscle. In some cases the growth developed after a single injection of from 18 to 30 mgs., in others after repeated injections, in which from 10 to 30 mgs., in all, were given. The tumors developed after a latency period of three months and caused the animal's death a couple of months later. There were great individual differences in their development and growth, however. In 5 cases he found metastases to the lung, in 1 case to the kidney, in 1 case to the abdominal cavity.

Burrows (1932) injected 1 c. c. of an emulsion containing 0.1 per cent of 1:2:5:6-dibenzanthracene at weekly intervals into 10 rats. All the test-animals were alive by the time when the first tumor appeared, and in 8 of them growths were ascertained between the twenty-third and the forty-ninth week, on the average forty weeks after the experiment had been started. The tumors were infiltratively growing spindle cell tumors of polymorphous appearance. In most cases they were multiple and accompanied by ascites. They were variously situated in the parietal peritoneum, the pyloric region, the stomach, the diaphragm, the ureter, the mesentery, the pelvis minor, the liver or the pancreas.

There are several reports of unsuccessful attempts to produce tumors in the liver of rats by deposition in that organ of 1:2:5:6-dibenzanthracene, 3:4-benzpyrene or methylcholanthrene (*Ilfeld*, 1936; *Oberling*, *Sannié*, *Guérin* and *Guérin*, 1936; *Woglom*, 1938). But *Oberlin*, *Guérin* and *Guérin* (1939 a) also report an experiment in which polymorphocellular sarcoma developed in the liver of rats after injection of 3:4-benzpyrene into the hepatic tissue. Their experiment involved 10 rats. Two of them were eliminated during the first 14 months; the remaining 8 developed sarcomas at the site of injection after 16 to 25 months.

The only reported attempt to produce tumors in the spleen was made by *Ilfeld* (1936). He inserted pellets of cholesterol

containing 1:2:5:6-dibenzanthracene or methylcholanthrene into the spleen of 7 rats, but in all cases with negative result.

Also a number of negative results of deposition in the kidney are reported (*Oberling, Sannié, Guérin and Guérin*, 1936; *Woglom*, 1938), but in an experiment by *Ilfeld* (1936), on 7 rats, epidermoid carcinomas developed in the kidney of 2 of the animals respectively 6 and 10½ months after the insertion of cholesterol pellets in which had been dissolved from 0.3 to 0.6 mgs. of 1:2:5:6-dibenzanthracene. In another experiment, with methylcholanthrene injected into the kidneys of 2 rats, the result was negative. A tumor similar to the one obtained by *Ilfeld* was found by *Oberling, Sannié and Guérin* (1937) in 1 of 5 rats into the kidneys of which 3:4-benzpyrene crystals had been inserted 10 months previously.

Some attempts by *P. Moeller* (1924) to produce tumors in the skin of rats by painting with coal tar resulted in the development of bronchogenic, squamous epitheliomas in some of the animals. It is claimed that the substance is carried into the lungs by inhalation of particles containing tar. When the object has been to produce tumors in the respiratory tract by means of carcinogenic hydrocarbons, the compounds have been administered intratracheally. In this manner, *Oberling, Sannié, Guérin and Guérin* (1936) produced peritracheal sarcomas in 2 of 10 rats by a single injection of 0.2 to 0.3 mgs. of 3:4-benzpyrene dissolved in oil; the tumors appearing respectively 3½ and 4½ months after the injection. *Valade* (1937) reports a similar experiment with methylcholanthrene. After 25 days to 5 months — in the average after 3 months — peritracheal sarcomas or rhabdomyosarcomas developed in the esophagus of 14 of his 50 test-animals.

The development of sarcomas in the genitals of rats after injection of tar into the uterus has been reported by *Teutschlaender* (1924), *Momigliano* (1929) and *Badile and Maurizio* (1931). *Woglom* (1938), on the other hand, failed to produce tumors either in the testes or the uterus of a large animal material by means of 3:4-benzpyrene. *McEuen* (1936), too, got only negative results in his attempts with

intrauterine injection of 1:2:5:6-dibenzanthracene. *Gullotta* (1939) succeeded in producing sarcoma in the testis of 1 out of 14 rats in which 0.3 mg. doses of a 25 per cent solution of 3:4-benzpyrene had been injected into the organ at intervals of 30 days.

The development of a tumor in the brain of a rat after intracranial injection of 1:2:5:6-dibenzanthracene is reported by *Weil* (1938). He judges the growth to be an epidermoid carcinoma. Other experiments, by *Oberling*, *Guérin* and *Guérin* (1936) and by *Seligman* and *Shear* (1937), with injection of 3:4-benzpyrene or methylcholanthrene have all given negative results.

The results of all these experiments with introduction of carcinogenic hydrocarbons into various tissues and organs have thus been anything but uniform. This is undoubtedly in a great measure due to the fact that in most instances the total dose of the compound used has been too small, — less than 1 milligram. In my experiments I therefore decided to operate with doses as large as 10 mgs., and among the hydrocarbons I chose methylcholanthrene, which according to *Barry*, *Cook*, *Haslewood*, *Hewett*, *Hieger* and *Kennaway* (1935) and *Fieser* (1938) is outstanding in its potency to produce tumors rapidly and with certainty in mice.

Technic.

The deposition of carcinogenic hydrocarbons in inner organs, for instance in the liver or kidney, must be done in a single injection; otherwise it becomes difficult to carry the experiments through, owing to mortality among the animals as result of the repeated insults. Besides, the substance must be deposited in such a manner that it causes the least possible lesion and tension in the organ.

In the performance of the experiments I followed the method indicated by *Shear* (1936). With precautions for absolute sterility the methylcholanthrene crystals were moistened with glycering until a thick, pasty mass was formed, and this was by means of a tightly fitting stylet aspirated into an old-fashioned lumbar cannula with an outside diameter of 1.5 mm. and a lumen of 0.8 mm.. Prior to

the injection or operation, the part of the animal's skin where the introduction was to be made was epilated and treated with 70 per cent alcohol.

For deposition in subcutaneous tissue or in the mammary region the animals were not anesthetised; for the experiments involving operative intervention they were anesthetised with ether. In order to avoid infection or wound formation at the objective point of the experiment, the cannula was introduced 4—5 cm. away from the point where it was intended to deposit the carcinogenic substance.

Intramuscular injections were done in the thigh after the fascia had been exposed by a snip through the skin and subcutaneous tissue. The wound was sutured with catgut and painted with colloidum. This technic ensures that the methylcholanthrene is deposited in the muscle and not, by accident, in the subcutaneous tissue. Intraperitoneal injections were done by introducing the cannula at a point midway on the abdomen. For this operation, the animal was anesthetised in order to prevent it from straining or moving, whereby there would be greater risk of the cannula injuring some of the inner organs. In liver, spleen and kidney the deposition was made after laparotomy had been performed. Also the injections into thyroid gland and testes were made after the organ had been exposed by operation. Into the neck of the uterus the compound is readily introduced after the vagina has been dilated.

To place the methylcholanthrene in the lung, a small snip was made through the skin and muscles at a point immediately lateral to the lower part of the sternum, so that the thoracic wall was exposed. The cannula was then carried in through one of the intercostal spaces, in the medioclavicular line, in an upward and posterior direction; the object being to get the substance deposited in the upper part of the right lung. Experiments on mice (*Esmarch*, 1940) have shown that deposition of the fine crystals in the lung tissue is inexpedient, because a large part of the methylcholanthrene is liable to get into the alveoles, from where it may, through the bronchi, be carried out of the organism.

In the brain, the methylcholanthrene was introduced into the tissue of one of the hemispheres after trepanation with a ball-trephine.

The animals used in the experiments were white rats, from 6 weeks to 2 months old, weighing between 100 and 125 grams. Each experiment comprised 10 animals. Half of these were prior to the experiment exposed to all-over irradiation with roentgen: 160 kv.; 4 ma.; 4 mm. Al.; half layer value, 0.55 Cu.; distance, 60 cm.; intensity, 11.9 r/min.; dose, 330 r.. Strange to say, neither the individual experiments nor the investigation as a whole showed

any difference between the irradiated and the non-irradiated animals either as regards the character of the tumors, their tendency to metastasis, the length of the latency period before their appearance or the proportion of growths obtained. In summing up my results I have therefore not taken this roentgenisation into account. Neither is any notice made of the animal's sex, as no difference could be demonstrated between the reactions in male and female.

All the tumor-bearing animals were allowed to die from their tumor. After 15 months all the remaining, in which no growth had developed, were killed, and the whole investigation brought to an end. In experiments on the inner organs it is impossible to ascertain the time at which the tumors begin to develop, as, on account of their situation, they cannot be palpated until they have attained a considerable size. I have therefore been obliged to take, as criterion for the experimental results, the time from the methylcholanthrene was administered till the animal died. The statements in this respect are influenced, however, by incidental deaths among the test animals, and the size of the tumors at the time of death is by no means the same. In some parts of the organism rather small tumors may cause death, owing to mechanical conditions. As the criterion is thus uncertain, it is only claimed to be exact within half a month of possible error. In the experiments in which the methylcholanthrene was deposited subcutaneously beneath the skin of the back, the tumors could generally be ascertained a couple of months before the animal's death.

The first of the tumor-bearing rats died 2 months after the investigation had been started. No account is taken of animals that died from accidental causes before that time.

During the time of the experiments, the animals were kept singly in wire cages. They had free access to water and were fed from a mixture consisting of 4 kg. of rice flour, 3 kg. of skimmed-milk powder, 1.5 kg. of brewer's yeast, 1.5 kg. of cocoanut fat (neutrex fat), 7.5 grams of Decamin (halibut-liver oil containing 7000 i.u. of vitamin-A and 500 i.u. of vitamin-D per gram). This is an excellent feed where it is a question of experiments extending over a considerable length of time. It keeps the older animals that do not get tumors healthy and well nourished.

Experiments.

Most of the tumors produced were of two kinds, which I have designated respectively as sarcomas and squamous

epitheliomas. The sarcomas were extremely rich in cells, with very scanty ground-substance (Fig. 1). There was no characteristic arrangement of the cells, which varied in size and shape. Though their appearance was decidedly polymorphous the spindle-shape predominated, varying from short, bluntish

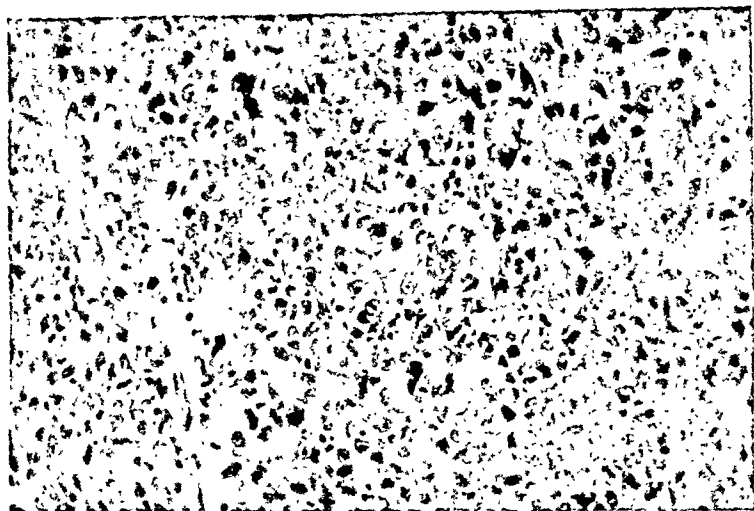


Fig. 1.

Sarcoma of polymorphous Character produced by Deposition of Methylcholanthrene in the Neck of the Uterus ($\times 250$).

forms to longer, more slender elements. Many of the tumors contained cells with cross-striped cytoplasm, but these occurred chiefly in the marginal portions, where the tumor invaded and infiltrated striated muscle. I have therefore not felt warranted in regarding these formations as rhabdomyosarcomas. Polynuclear cells and giant cells were not uncommon. Compared with the squamous epitheliomas, the sarcomas had fewer mitoses. Staining by the method of van Gieson-Hansen only seldom showed collagenic fibrils in the scanty ground-substance.

In the squamous epitheliomas, the tumor cells lay arranged in coarser or finer, irregular heaps or streaks, with ill-defined delimitation from a scanty connective-tissue stroma

(Fig. 2). In the central portion of the streaks there were keratinisations in the form of epithelial pearls or more solid trabeculae. Adjoining these there were mostly squamoepithelial cells containing keratohyalin, and, peripherally to these, atypical, irregularly arranged cubic, cylindric, oval or more

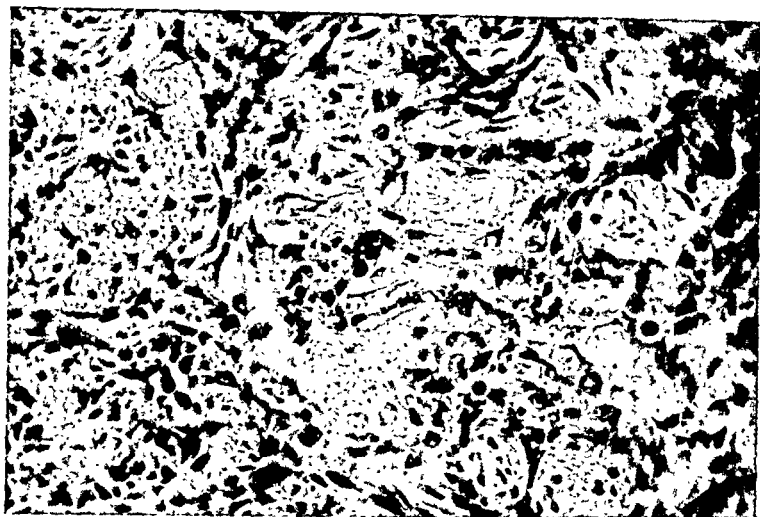


Fig. 2.

Squamous Epithelioma produced by Deposition of Methylcholanthrene in the thyroid Gland ($\times 250$).

polygonal cells. As a rule, the cells contained only a single nucleus with a somewhat varying chromatin content. In the peripheral portions of the epithelial streaks, mitoses were frequent. The scanty connective-tissue stroma had a distinct network of fibrils, which could be stained by van Gieson-Hansen's method. The tumors invaded and infiltrated the surrounding tissues.

The experiment in which the methylcholanthrene was deposited *subcutaneously, beneath the skin of the animal's back*, comprised 9 animals which were alive 2 months after the investigation was begun. Of these, 7 died after 3 to 14 months (average, 10 months), with tumors to the size of a tangerine at the site of injection. The two others were killed

after 15 months, with no signs of tumor formation. In this and the following experiments in which the methylcholanthrene was deposited in the superficial layers, the tumor generally caused the animal's death within a couple of months after its presence had been ascertained.

Of 10 female rats into which the methylcholanthrene was injected into the *mammary tissue*, beneath a papilla in the left inguinal region, 8 died with sarcomas at the site of deposition between the 8th and 15th month, on the average after $10\frac{1}{2}$ months. The tumors were of about the same size as those in the preceding experiment. In one of the animals, which died after $6\frac{1}{2}$ months, metastases were found in the thymus and in various parts of the peritoneal cavity. The remaining two died without tumors after respectively $5\frac{1}{2}$ and $9\frac{1}{2}$ months. In a corresponding experiment with 10 male rats, 8 died with sarcomas after 2 to 14 months (average, $8\frac{1}{2}$ months). In one animal, which died after 13 months, metastases were found in the mesentery of the intestine and in the subcutaneous tissue of the thorax. The two last rats were killed at the termination of the experiment. In none of them was there any sign of tumor formation. At no time during these experiments were either hyperplastic or metaplastic processes found in the mamma or its afferent ducts.

After *intramuscular injection*, 7 rats died with sarcomas at the site of injection after 7 to 14 months (average, $10\frac{1}{2}$ months). Some of the tumors were as large as a tangerine. In two of these animals, which died after $9\frac{1}{2}$ months, metastases were found, in one of them in the lung, in the other in a lymph node on the anterior aspect of the spine. The remaining 3 animals died from intercurrent diseases respectively $2\frac{1}{2}$, 7 and 15 months after the beginning of the experiment. In none of them were there any signs of tumor growth.

Deposition in the *thyroid gland* produced tumors in 6 animals. In three of them, which died 6 months after the injection, sarcomas were found; the three others got squamous epitheliomas at the site of deposition and died after respectively 3, 6 and $8\frac{1}{2}$ months. Of the remaining 4, two were alive 2

months after the beginning of the experiment. After observation for respectively 2 and $4\frac{1}{2}$ months no tumors were found.

The experiment in which the methylcholanthrene was deposited *intraperitoneally* comprised 8 rats. In 5 of these the hydrocarbon gave rise to solitary sarcomas in the wall of the abdomen, in 2 others to multiple sarcomas in the peritoneal cavity, all through which there were innumerable tumor growths of various size. The largest were for the most part situated in the anterior wall of the abdomen, in the diaphragm and the mesentery. The rats with sarcomas in the abdominal cavity died after from $5\frac{1}{2}$ to 10 months (average, $6\frac{1}{2}$ months). The tumors in this site were often accompanied by ascites. One animal died after an experimental period of 4 months, and no signs of tumor were found.

The 10 rats in which the methylcholanthrene was deposited in the *liver* were all alive 2 months after the beginning of the experiment.

After opening of the peritoneum and injection into the organs it is not always possible to avoid the development of tumors at the site of the laparotomy incision. Lesions of the highly vascularised abdominal organs with the cannula will often cause some bleeding, which will result in methylcholanthrene crystals being carried into various parts of the peritoneum. Experience from previous experiments with deposition of the compound *intraperitoneally* seems to show that the anterior wall of the abdomen is particularly susceptible to tumor formation, and growths in that region must therefore not be regarded as metastases.

In 3 animals, injection into the liver gave rise to plum-sized sarcomas at the site of deposition in that organ. They died respectively 6, $9\frac{1}{2}$ and 12 months after the injection. In a fourth, which died after an experimental period of $5\frac{1}{2}$ months, two separate sarcomas were found, one at the site of deposition, the other in the anterior wall of the abdomen. A fifth rat, which died after $6\frac{1}{2}$ months, had a sarcoma in the abdominal wall and a large, white-granuled tumor at the site of deposition. Its limits were ill-defined, and it invaded and infiltrated the abdominal wall and the muscles of the

diaphragm, independently of the other. Microscopy showed it to be a lymphoblastoma, as it was composed almost exclusively of round cells which could only be interpreted as medium-sized and — especially — large lymphocytes (Fig. 3). The arrangement of the cells was uncharacteristic. There

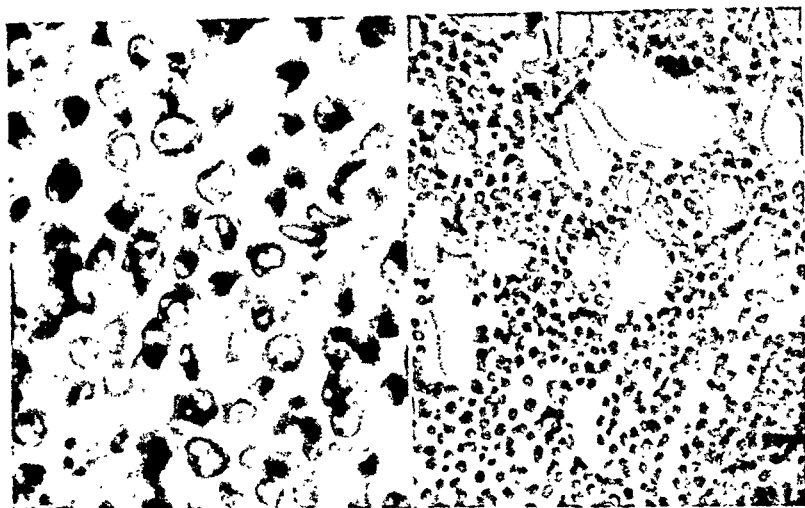


Fig. 3.

Lymphoblastoma produced by Deposition of Methylcholanthrene in the Liver. *Left*: Portion of the Tumor ($\times 1150$). *Right*: Ingrowth into striated Muscle ($\times 250$).

were a few mitoses, no reticulum cells, and no collagenic fibrils in the scanty ground-substance. Neither this animal nor the next mentioned had been subjected to irradiation with roentgen.

The sixth rat died after 9 months with a whitish tumor, the size of a hen's egg, at the site of deposition in the liver. Histologically, the growth consisted of tissue of the same appearance as the sarcomas, but here and there there were tubular formations which rather suggested proliferation from the bile ducts (Fig. 4). The tubes had a distinct lumen and were covered with a single layer of cylindric or cubic cells well-defined from the surroundings. There were only a few

mitoses. As there were no solid strings of cells, or atypical cells disposed in several rows, these cells could hardly, from the histological findings, be regarded as possessing malignant characters. But the tumor had metastasised to the lung, and the fact that the metastases there were of precisely the same

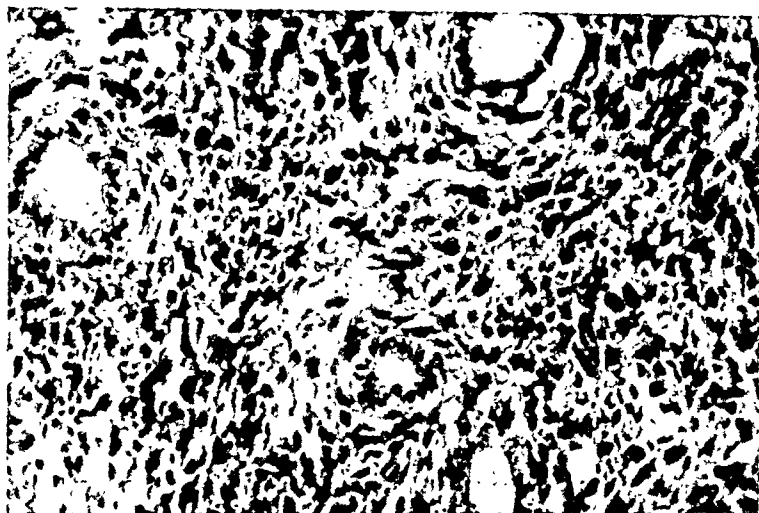


Fig. 4.

Carcinosarcoma produced by Deposition of Methylcholanthrene in the Liver ($\times 250$).

composition as the primary tumor seems to warrant the conclusion that it was a carcinosarcoma. Besides the metastases in the lung there was, moreover, a characteristic squamous epithelioma. *P. Moeller* (1924) has produced primary, bronchogenic, squamous epitheliomas in rats by painting with coal tar. It must therefore be supposed either that the squamous epithelioma in my experiment was spontaneous, or else that the carcinogenic compound had had an effect outside the place where it was deposited. The latter assumption is supported by experiments on mice by myself and others. Also, it has been proved that carcinogenic hydrocarbons can be taken up by the organism and converted there (*Esmarch*, 1940).

The remaining 4 rats died without tumors in the liver; two of them after respectively $6\frac{1}{2}$ and $8\frac{1}{2}$ months, with sarcomas in the anterior wall of the abdomen, the two others



Fig. 5.

Rat with Sarcoma in the Kidney produced by Deposition of Methylcholanthrene in the Organ.

after respectively 3 and 5 months without any signs of tumor growth.

Deposition of methylcholanthrene in the *spleen* gave rise to sarcomas of that organ in 5 rats. Some of the tumors were the size of a plum. The animals died after $6\frac{1}{2}$ to 14 months (average, 10 months). Four of them had tumors also in the anterior wall of the abdomen or in other parts of the peritoneal cavity, the fifth only in the spleen. The other 5 animals died after periods of 8 to 11 months. They all had sarcomas in the abdominal wall, but in none of them was there any demonstrable tumor formation in the spleen.

Injection into the *kidney* produced sarcomas of that organ in 6 rats (Fig. 5), which died after periods of 6 to 13 months

(average, 8 months). One rat, which died after 12½ months, had a squamoepithelial carcinoma in the kidney in which the methyleholanthrene had been deposited. The remaining three had no tumors in the kidney. One of them died after 6 months with sarcomas in other parts of the peritoneal cavity;



Fig. 6.

Rat with Sarcoma of the Uterus after Injection of Methyleholanthrene in that Organ. The Tumor is seen in the middle of the Picture, behind the distended Urinary Bladder and in front of the much dilated Large Intestine.

in the other two no tumor growths had developed by the time when the experiment was terminated.

The experiment with deposition in *the lung* comprised 9 animals that were alive 2 months after the methyleholanthrene had been injected. Three of them died, 4½ months after the beginning of the experiment, with sarcomas which filled the entire right lung and invaded the mediastinum. The others had no tumors in the lung. Five of them died after observation periods of from 3½ to 9½ months, with sarcomas in the thoracic wall, the mediastinum or the diaphragm, perhaps resulting from the methyleholanthrene having been deposited between the pleural layers, perhaps because a little of the fine crystalline substance had stuck there when the point of

the cannula pierced the thoracic wall. The ninth rat died 5 months after the injection, with no signs of tumor formation.

Deposition in the *cervix uteri* gave sarcomas at that site in 5 rats, which died after 5 to 9 months (average, 7 months); see Fig. 6. In one of the animals there were metastases to the lungs. In the other 5, no tumors were produced. One of them died after an observation time of $2\frac{1}{2}$ months, the other four lived from $9\frac{1}{2}$ to 15 months after the injection.

Injection into *the testes* gave negative result in all the 9 rats which had survived the first 2 months of the experiment. Three of them died after respectively 5, $10\frac{1}{2}$ and 13 months, the other 6 were killed at the end of the experimental period of 15 months.

While all the preceding experiments had been made with 10 rats to each, the one in which the methylcholanthrene was deposited in *the brain* included 3 separate groups of 10 rats each. The operative procedure in connexion with the injection caused only little mortality among the animals, but 2—3 weeks after most of them died. The autopsies gave no clue to the cause of death, but it must be supposed that the deaths were due to intoxication from the methylcholanthrene owing to the rapid dissolution of the fine crystals of that substance by the lipids of the brain, and the higher concentration in which the hydrocarbon is thus introduced into the organism, compared with the other experiments. This supposition is supported by the fact that remnants of the methylcholanthrene were rarely found in the brain. Besides, a toxic effect of the substance has under certain conditions been observed in experiments with mice (*Esmarch*, 1940). Of the 30 rats in the three experiments, only 4 were alive 2 months after the injection had been made. Two of these died after an observation time of 7 months, the other two after respectively $8\frac{1}{2}$ and $9\frac{1}{2}$ months. On autopsy, no signs of tumor growth were found in the brain tissue of any of them, but all four had sarcomas in the subcutaneous tissue. These had been visible for a couple of months, and by the time the animals died they were as large as a good-sized walnut.

Discussion.

In a series of experiments with rats, 10 mgs. of crystalline methylcholanthrene moistened with glycerin were deposited in various tissues and organs of these animals, — subcutaneous and mammary tissue, striated muscle, thyroid gland, peritoneum, liver, spleen, kidney, uterus, testes and brain. Seventy-two malignant tumors, in all, were produced at these sites, viz. 66 sarcomas (5 of them with metastases), 4 squamous epitheliomas, 1 lymphoblastoma and 1 carcinosarcoma. The squamous epitheliomas occurred in thyroid glands and in one case in the kidney, but in other rats the injections into these organs gave rise to sarcomas. The lymphoblastoma and the carcinosarcoma occurred in livers, but in this organ, too, injections into other rats produced sarcomas. The epithelial portions of the carcinosarcoma make one think of the cholangiomas produced by *Sasaki* and *Yoshida* (1935) by feeding with o-amidoazotoluol. The morphological character of the sarcomas was the same in the different sites.

In the individual experiments, the duration of the life of the tumor-bearing animals varied; but though the material in each case was small and the criterion for the result of the experiments (the time from the injection until the animal's death) for several reasons uncertain, the mean average of life in the different experiments was nevertheless so nearly the same that it may be assumed that — so far as the organs here examined are concerned — the time it takes for the tumors to develop is essentially the same in them all.

As regards the production of tumors by intracerebral injection my results were negative, whereas *Weil* (1938) in a similar experiment with 1:2:5:6-dibenzanthracene succeeded in producing an epidermoid sarcoma. Also my experiment with injection into testes gave a negative result, though *Gullotta* (1939) reports the production of a sarcoma in that organ after injection of 3:4-benzpyrene.

Other investigators have experimented with deposition of

carcinogenic compounds in several organs besides those mentioned in the present report. Thus, *Moore* and *Melchionna* (1937) succeeded in producing squamoepithelial carcinomas of the prostate in 13 rats, and sarcoma in 1, by injection of 3:4-benzpyrene, and *Bencke* and *Schroeder* (1939) obtained polymorphocellular sarcomas in 2 out of 53 rats by injection of the same compound into the parotid gland. *Brunschwig* (1938) injected methylcholanthrene into the bone marrow of the proximal or distal end of the femur of 53 rats with the result that after 8 to 12 months parosteal or central fibrosarcomas developed at the site of injection in 4 of them. An experiment by *Thomas* (1937) with injection of methylcholanthrene into the anterior chamber of the eyes of 18 rats gave an entirely negative result.

Taken as a whole, the results of my own experiments, as well as of those of other investigators, show that carcinogenic hydrocarbons will produce sarcomas and squamous epitheliomas when deposited in various tissues and organs of rats. The results of experiments with this animal thus correspond with my own experience in this respect with mice (*Esmarch*, 1940).

Summary.

Under identical experimental conditions and with the use of a reliable technic, methylcholanthrene was deposited in various tissues and organs of rats. In all, 66 sarcomas, 4 squamous epitheliomas, 1 carcinosarcoma and 1 lymphoblastoma were produced. Deposition in subcutaneous and mammary tissue, striated muscle, peritoneum, spleen, lung and uterus gave rise only to sarcomas. Deposition in thyroid gland and kidney gave rise both to sarcomas and to squamous epitheliomas. In liver, the carcinogenic compound produced, besides sarcomas, a carcinosarcoma and a lymphoblastoma.

LITERATURE.

- Bachmann, W. E., Cook, J. W., Dansi, A., de Worms, C. G. M., Haslewood, G. A. D., Hewett, C. L. & Robinson, A. M.: Proc. Roy. Soc., Ser. B. 1937, 123 p. 343.
- Badile, P. L. & Maurizio, E.: Atti Soc. med.-chir. Padova 1931, 8 p. 277.
- Ball, H. A. & Samuels, L. T.: Am. J. Cancer 1936, 26 p. 547.
- Barry, G., Cook, J. W., Haslewood, G. A. D., Hewett, C. L., Hieger, I. & Kennaway, E. L.: Proc. Roy. Soc., Ser. B. 1935, 117 p. 318.
- Benecke, E. & Schröder, J.: Ztschr. f. Krebsforsch. 1939, 49 p. 505.
- Berenblum, I. & Kendal, L. P.: Brit. J. Exp. Path. 1934, 15 p. 366.
- Brunschwig, A.: Am. J. Cancer 1938, 34 p. 540.
- Brunschwig, A. & Tschetter, D.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 1937, 36 p. 439.
- Burrows, H.: Proc. Roy. Soc., Ser. B. 1932, 111 p. 238.
- Burrows, H., Hieger, I. & Kennaway, E. L.: Am. J. Cancer 1932, 16 p. 57.
- Dunning, W. F., Curtis, M. R. & Bullock, F. D.: Am. J. Cancer 1936, 28 p. 681.
- Esmarch, O.: Studier over Methylcholantren og dets kræftfremkaldende Virkning paa Mus. Kobenhavn, 1940.
- Fieser, L. F.: Am. J. Cancer 1938, 34 p. 37.
- Guilera, L. G., Roca, R. & Corachan, M.: Compt. rend. Soc. de Biol. 1930, 103 p. 739.
- Gullotta, G.: Boll. Soc. med.-chir. Catania 1939, 7 p. 129.
- Haagensen, C. D. & Krehbiel, O. F.: Am. J. Cancer 1936, 26 p. 368.
- Ilfeld, F. W.: Am. J. Cancer 1936, 26 p. 743.
- Klinke, J.: Ztschr. f. Krebsforsch. 1938, 47 p. 348.
- Maisin, J. & Coolen, M.-L.: Compt. rend. Soc. de Biol. 1934, 117 p. 109.
- McEuen, C. S.: Am. J. Cancer 1936, 27 p. 91.
- Am. J. Cancer 1939, 36 p. 551.
- Momigliano, E.: Arch. Ital. di Ostet. 1929, 36 p. 1083.
- Moore, R. A. & Melchionna, R. H.: Am. J. Cancer 1937, 30 p. 731.
- Møller, P.: Acta Path. et Microbiol. Scand. 1924, 1 p. 412.
- Oberling, C., Guérin, M. & P.: Compt. rend. Soc. de Biol. 1936, 123 p. 1152.
- Bull. l'Assoc. franc. p. l'Étude du Cancer 1939 a, 28 p. 198.
- Compt. rend. Soc. de Biol. 1939 b, 130 p. 417.
- Oberling, C., Sannicé, C. & Cuérin, P.: V^e Conf. de la Leeuwenhoeck-Vereenig. Amsterdam 1937 p. 57.
- Oberling, C., Sannicé, C., Guérin, M. & P.: Bull. l'Assoc. franc. p. l'Étude du Cancer 1936, 25 p. 156.

- Rondoni, P.: Ztschr. f. Krebsforsch. 1938, 47 p. 59.
 Russels, B. R. G.: J. Path. & Bact. 1922, 25 p. 409.
 Sasaki, T. & Yoshida, T.: Virchows Arch. 1935, 295 p. 175.
 Seelig, M. G. & Cooper, Z. K.: Am. J. Cancer 1933, 17 p. 589.
 Seligman, A. M. & Shear, M. J.: Am. J. Cancer, 1939, 37 p. 364.
 Shear, M. J.: Am. J. Cancer 1936, 26 p. 322.
 Teutschlaender: Dtsch. med. Wchnschr. 1924, 50 p. 1051.
 Thomas, J.-A.: Compt. rend. Soc. de Biol. 1937, 126 p. 1176.
 Tsutsui, H.: Gann 1918, 42 p. 17.
 Valade, P.: Compt. rend. l'Acad. Sci. 1937, 204 p. 1281.
 Weil, A.: Arch. Path. 1938, 26 p. 777.
 Woglom, W. H.: Arch. Path. 1926, 2 p. 522 & 709.
 — Am. J. Cancer 1938, 32 p. 447.
 Yamagiva, K. & Ichikawa, K.: Mitteil. Med. Fakultät Kaiserl. Univ.
 Tokyo 1916, 15 p. 295.

THE GUINEA-PIG AS EXPERIMENTAL ANIMAL IN CANCER RESEARCH.*)

By Ole Esmarch, M. D.

(Received for publication May 12th, 1941).

Mice are the animals mostly used in that part of experimental cancer research which aims at producing tumors by the application of tar or carcinogenic hydrocarbons. Rats have been used only to a lesser extent in such investigations, probably because attempts to produce malignant tumors in these animals by painting have practically never been successful. It has been found, however, that tumors could without difficulty be produced in rats by depositing a carcinogenic hydrocarbon like methylcholanthrene in the subcutaneous tissue or the inner organs (*Esmarch, 1941*).

Earlier experiments of similar kind on guinea-pigs show that numerous unsuccessful attempts have been made to produce malignant tumors in those animals by tar-painting of the skin (compilations of the extensive literature on tar cancer have been made by *Woglom, 1926*, and *Seelig and Cooper, 1933*); and attempts with cutaneous application of a carcinogenic hydrocarbon have given the same results (*Oberling, Sannié, Guérin and Guérin, 1936*).

There is a single report to the effect that attempts to produce tumors in the subcutaneous tissue of guinea-pigs by

*) Towards the expenses of this research grants were made by the Danish National Anti-Cancer League and the Anders Hasselbalch Foundation.

injection of solutions of 1:2:5:6-dibenzanthracene proved unsuccessful (*Schabad and Urinson, 1938*); on the other hand, *Haagensen and Krehbiel (1936)* describe an experiment in which tumors were produced in this animal. It comprised 13 animals, which lived for over 342 days after the experiment had been started, which is the average time for development of the tumors. Repeated multiple, subcutaneous injections of 3:4-benzpyrene dissolved in fat were given, and in 5 of the animals 8 tumors, in all, developed at the site of injection, 4 of them fibrosarcomas, 4 liposarcomas. Attempts at transplantation were unsuccessful, and metastases were not seen. *Shear (1938)* reports an experiment involving 23 guinea-pigs which were given subcutaneous injections of 5 mg. of 3:4-benzpyrene, and in 2 of which slow-growing subcutaneous tumors developed.

Experiments with deposition of tar of carcinogenic hydrocarbons in guinea-pigs in any other sites than the subcutaneous tissue have been very few. *Schabad and Urinson (1938)* injected from 8 to 48 mg. of 1:2:5:6-dibenzanthrene intraperitoneally and found no tumors after an observation time of 19 months. *Kazama (1922)* reports the development of adenocarcinomas in the gall bladder of guinea-pigs after injection of tar into the organ. *Kimura (1923)* injected coal tar into the bronchi of tracheotomised guinea-pigs and found adenocarcinomas in the lungs of 3 of 10 animals killed after an observation time of 140 days. *Athias (1937)* injected methylcholantrene dissolved in peanut oil into the brain of 33 guinea-pigs, but found no tumors after an observation time of 160 days.

The earlier attempts to produce tumors in guinea-pigs by means of tar or carcinogenic hydrocarbons have thus not given uniform results: still, they show that it is possible experimentally to produce tumors in an animal species in which spontaneous, malignant growths have only rarely been demonstrated (*Maury, 1931; Haagensen and Krehbiel, 1936*). The positive results have been obtained especially with 3:4-benzpyrene, which with certainty and in brief time produces

tumors in mice (*Barry, Cook, Haslewood, Hewett, Hieger and Kennaway, 1935; Maisin and Liégois, 1934*).

In my own experiments on guinea-pigs I have preferred to use methylcholanthrene, which in experiments on mice has proved more active than 3:4-benzpyrene (*Fieser, 1938*). The crystalline substance was introduced subcutaneously, in doses of 10 mg., underneath the skin of the back or in the peritoneum.

Technic.

The 10 mg. of methylcholanthrene were moistened with glycerol and in a single injection introduced into the organism of the animal by the same method as in my experiments with rats (1941).

The guinea-pigs used weighed about 500 grams. In order to secure a certain uniformity of material they were all obtained from the same breeder. Each investigation comprised 10 animals. They were kept in cages with a wooden floor. This seems to be a very important precaution in experiments with guinea-pigs extending over a great length of time, and practically ensures against losses through accidental death of any of the animals. In the 23 months that the investigation lasted, the animals were fed on oats, beets, carrots, grass, various greens and cabbage; a diet which completely covered their needs during the long experimental period.

The transplantation of the tumors was done by the operative method devised by *Krebs (1929)*, which, by *Thrane's investigations (1935)* has been shown to be superior to transfer through cannula.

Experiments.

The result of the experiment in which the 10 milligrams of methylcholanthrene were deposited subcutaneously, under the skin of the animal's back, is shown in Table I.

In 3 of the 10 animals, tumors developed at the site of injection after an experimental period of from 13½ to 21 months. In the regions in which I had chosen to make the injections, the growths do not become palpable until they have attained a rather considerable size. The tumors found grew rapidly and progressively, and by the time the animals

Table I.

Guinea-pig No.	Sex.	Duration of Experiment (in months)		Result
		k = killed;	d = died.	
4	Female	d	8	No tumor
2	"	d	12	" "
7	"	k	14	Sarcoma after 13½ months
5	"	k	15	" " 14 "
10	"	k	21	" " 21 "
1	"	k	23	No tumor
3	"	k	23	" "
6	"	k	23	" "
8	"	k	23	" "
9	"	k	23	" "

were killed they were from plum- to tangerine size (Fig. 1). There were no metastases; but it must be remembered that the animals were killed shortly after the growths had been ascertained.



Fig. 1.

Subcutaneous Tumor in the interscapular Region after Injection of Methylcholanthrene.

The result of the experiment in which the methylcholanthrene was injected into the peritoneum will be seen from Table II.

Table II.

Guinea-pig No.	Sex.	Duration of Experiment (in months)		Result
		k = killed;	d = died.	
11	Male	d	13	Sarcome in ant. wall of abdomen
19	Female	d	13	No tumor
13	Male	d	17	" "
12	"	k	18½	Sarcoma in ant. wall of abdomen
17	"	d	18½	" " " " " "
18	"	d	18½	" " " " " "
14	"	k	23	No tumor
15	"	k	23	" "
16	"	k	23	" "
20	"	k	23	" "

In 4 of the animals, tumors developed in the anterior wall of the abdomen, from 13 to 18½ months after the injection. There were no metastases. The ill defined, plum- to tangerine-sized growths were not accompanied by ascites. They were all solitary, whereas earlier experiments in which methylcholanthrene was deposited intraperitoneally, with the same technic, in mice (*Esmarch*, 1940) or rats (*Esmarch*, 1941) oftenest resulted in the formation of multiple tumors. As a rule, the presence of the tumor was not ascertained until the animal was examined post mortem; only in one case (guinea-pig no. 12) could it be palpated in vivo. The experiment, like the preceding one, was terminated 23 months after the injection of the carcinogenic hydrocarbon.

I had thus succeeded in producing, experimentally, 7 sarcomas in guinea-pigs. Histologically, the growths proved to be either infiltratively growing spindle cell sarcomas or spindle cell sarcomas of a somewhat polymorphous character. They were rich in cells, and with only sparse ground substance. The tumor cells lay for the most part disposed in heaps or in coarser or finer streaks. The form of the spindle cells varied

from short and blunt to long, more or less slender elements. As a rule, they contained only a single nucleus, which might be spindle shaped, oval or round. Here and there in the tumors were seen a few mitoses. After staining *ad modum van Gieson-Hansen*, only a few, rare, collagenic fibrils could be demonstrated in the scanty basic substance. In a couple of the

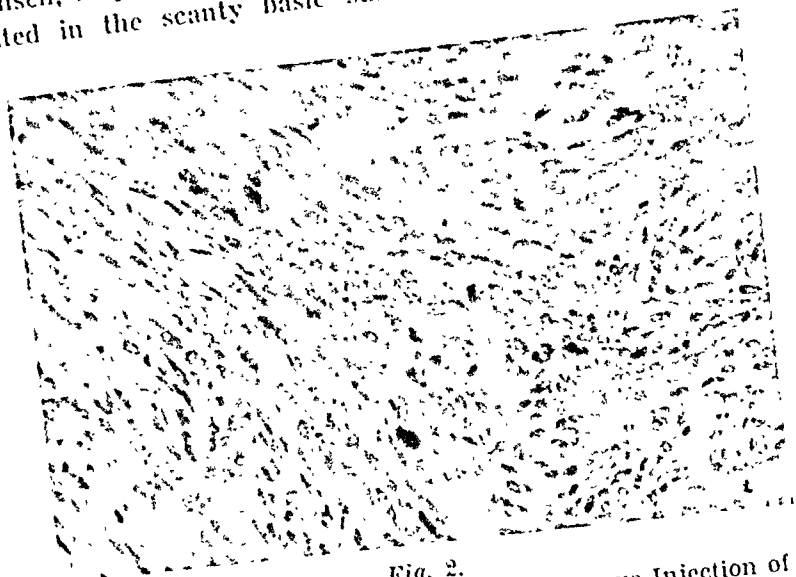


Fig. 2.
Spindle Cell Sarcoma produced by subcutaneous Injection of
Methylcholanthrene ($\times 250$).

tumors, the cells were of a more polymorphous character; still, the spindle-cell type preponderated. Only a few giant cells were found, rarely with more than two nuclei. There was no demonstrable histologic difference between the growths resulting from subcutaneous, and those resulting from intraperitoneal injection of the methylcholanthrene.

Of these sarcomas, I tried to transplant 3 to other guinea-pigs. With the tumors from no. 5 and no. 7 the results were negative, respectively on 6 and 14 animals; but with the spindle cell sarcoma from no. 12 progressively growing tumors were obtained in 3 of 10 animals inoculated. The growths were palpable 4 to 5 weeks after the transplantation, and

were histologically similar to the mother tumor. In the second passage there was lasting growth in 7 of 20 animals, and the tumor has since been carried forward at the institute.

Discussion.

The result of the experiments shows that it is possible to produce sarcomas experimentally in guinea-pigs with a carcinogenic hydrocarbon like methylcholanthrene. In about one-third of the animals involved, tumors developed within less than eighteen months. Moreover it was shown that such tumors can be transplanted successfully. That the »stakes« were so few in the first passages must undoubtedly be ascribed to the animal material. We have no inbred strains of guinea-pigs, such as of mice and rats, and in transplanting we are therefore no doubt faced by the same difficulties as those which were successfully overcome by C. O. Jensen (1902 and 1903) in his pioneer experiments with mice.

It would be an excellent thing if the guinea-pig could be used as experimental animal in cancer research, considering the advantages it presents both on account of its size and on account of its immunologic characters.

Summary.

In 3 of 10 guinea-pigs which had received subcutaneous injections of 10 mg. of methylcholanthrene, sarcomas developed at the site of injection after an experimental period of from 13 to 21 months. In 4 of 10 animals in which the substance had been deposited intraperitoneally, sarcomas developed in the abdominal cavity after 13 to 18½ months. One of the tumors was successfully transplanted to other guinea-pigs.

LITERATURE.

- Athias, A.: *Compt. rend. Soc. de Biol.* 1937, 126 p. 585.
- Barry, G., Cook, J. W., Haslewood, G. A. D., Hewett, C. L., Hieger, I. & Kennaway, E. L.: *Proc. Roy. Soc., Ser. B.* 1935, 117 p. 318.
- Esmarch, O.: *Studier over Methylcholantren og dets kræftfremkaldende Virkning paa Mus.* Copenhagen 1940.
- Acta path. et microbiol. Scand. 1942, 1, p. 79.
- Fieser, L. F.: *Am. J. Cancer* 1938, 34, p. 37.
- Haugensen, C. D. & Krehbiel, O. F.: *Am. J. Cancer* 1936, 27 p. 474.
- Jensen, C. O.: *Hospitalstidende* 1902 p. 489.
- Hospitalstidende 1903 p. 549.
- Kazama, Y.: *Gann* 1922, 46 p. 11.
- Kimura, N.: *Japan Med. World* 1923, 3 p. 45.
- Krebs, C.: The effect of roentgen irradiation on the interrelation between malignant tumors and their hosts. *Suppl. Acta radiol.* VIII. Stockholm, 1929.
- Maisin, J. & Liégeois, P.: *Compt. rend. Soc. de Biol.* 1934, 115 p. 733.
- Maury, A.: *Les tumeurs chez le cobaye.* Paris 1931.
- Oberling, C., Sannière, C., Guérin, M. & P.: *Bull. l'Assoc. Franç. p. l'Etud. du Cancer* 1936, 25 p. 156.
- Schabad, L. M. & Urinson, J. P.: *Arch. Sci. Biol. (Nauk)* 1938, 31 p. 105.
- Seelig, M. G. & Cooper, Z. K.: *Am. J. Cancer* 1933, 17 p. 589.
- Shear, M. J.: *Am. J. Cancer* 1938, 33 p. 499.
- Thranø, M.: Nogle røntgenbiologiske Forsøg med et transplantabelt Muscarcinom og et transplantabelt Muselymfosarcom som biologiske Objekter. Copenhagen 1935.
- Woglom, W. H.: *Arch. Path.* 1926, 2 pp. 533 & 709.

ÜBER ANTIGENBEZIEHUNGEN ZWISCHEN PNEUMOKOKKEN UND SALMONELLA- BAKTERIEN.

Von *F. Kauffmann* und *A. Langvad-Nielsen*.
(Eingegangen bei der Redaktion am 27. Mai 1911).

Bei Untersuchungen über Antigenbeziehungen zwischen *Salmonella*-Bakterien und *Pneumokokken* wurden einige übergreifende Reaktionen festgestellt, über die im folgenden kurz berichtet werden soll.

Es wurden *Kaninchen-Pneumokokken-Seren*, über deren Herstellung *F. Kauffmann*, *M. Bjorneboe* und *B. Vammen* berichtet haben, zu Reagensglas-Agglutinationsversuchen mit Alkohol-Suspensionen verschiedener *Salmonella*-Typen angewandt, und zwar in Verdünnungsreihen ab 1:20, fortlaufend um das Doppelte verdünnt. Die Agglutinationen wurden nach 20 std. Aufenthalte im Wasserbade von ca. 50° C. abgelesen. Es handelte sich hierbei um 57 *Kaninchen-Pneumokokken-Seren* folgender Typen: 1, 2, 3, 4, 5, 6 A, 6 B, 7, 7 A, 7 B, 7 C, 8, 9 L, 9 N, 9 V, 10, 10 A, 11, 11 A, 12, 13, 14, 15, 15 A, 15 B, 16, 17, 18, 18 A, 18 B, 19, 19 A, 19 B, 20, 21, 22, 22 A, 23, 23 A, 23 B, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 33 A, 34, 35, 35 A, 35 B, 36, 37, 38 und 39.

Über die Antigenbeziehungen dieser *Pneumokokken*-Typen unter einander haben *F. Kauffmann*, *E. Morch* und *K. Schmilt* bereits berichtet, sodass auf diese Mitteilung sowie eine demnächst folgende Arbeit von *E. Morch* verwiesen sei.

Zur Agglutination mit den oben erwähnten Pneumokokken-Seren wurden folgende Salmonella-Alkohol-Suspensionen benutzt:

S. paratyphi A, *S. paratyphi* A var. *durazzo*, *S. paratyphi* B, *S. essen*, *S. bredeney*, *S. schleissheim*, *S. cholerae* suis var. *kunzen-dorf*, *S. thompson*, *S. newport*, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. london*, *S. newington*, *S. senftenberg*, *S. aberdeen*, *S. poona*, *S. worthington*, *S. carrau*, *S. onderstepoort*, *S. hvittingfoss*, *S. kirkee*, *S. cerro*, *S. kentucky*, *S. minnesota*, *S. tel-aviv*, *S. hallerup* und *S. urbana*.

Die überwiegende Mehrzahl der ausgeführten Agglutinationen hatte ein negatives Resultat oder führte nur zu schwachen, praktisch bedeutungslosen Reaktionen. Mit verschiedenen Salmonella-Kulturen, deren hohe O-Empfindlichkeit bereits bekannt war (z. B. *S. bredeney*, *S. typhi*, *S. carrau*, *S. onderstepoort* u. a.), wurden in mehreren Pneumokokken-Seren schwache Reaktionen bis 1:20 resp. 1:40 erzielt, die hier unberücksichtigt bleiben sollen.

Im folgenden sollen nur 3 Pneumokokken-Seren besprochen werden, die zu *S. kirkee* deutliche Antigenbeziehungen aufweisen. Es sei nebenbei erwähnt, dass *S. kentucky* vom Pneumokokken-Serum Typ 22 bis 1:40 agglutiniert wurde. Wie es aus der Tabelle 1 hervorgeht, wurde *S. kirkee* von den 3 Pneumokokken-Seren der 35-Gruppe (35, 35 A und 35 B) stark agglutiniert, während umgekehrt das *S. kirkee*-Serum die Pneumokokken-Kulturen in der Verdünnung von 1:10 nicht beeinflusste. Bei geringeren Verdünnungen (1:4) kam es zu schwachen Reaktionen.

Absorbierte man das 35-Serum mit der homologen 35-Kultur, so entfernte man nicht nur die Pneumokokken-Antikörper, sondern gleichzeitig auch die Salmonella-Agglutinine. Absorbierte man dagegen das 35-Serum mit der *S. kirkee*-Kultur, so entfernte man nur die Salmonella-Agglutinine, während die Pneumokokken-Antikörper erhalten blieben.

Bei diesen übergreifenden Reaktionen zwischen den 3 Pneumokokken-Seren (35, 35 A und 35 B) und *S. kirkee* handelt es sich wahrscheinlich um ein gemeinsames Partialanti-

Tabelle 1.
Ergebnisse der Reagensglas-Agglutination.

Kulturen	Pneumokokken-Seren					O-Serum S. kirkee nicht absor- biert
	35			35 A	35 B	
	nicht absorbiert	absorbiert mit		nicht absorbiert	nicht absorbiert	
		35	S. kirkee			
Pn. 35	320	0	160	320	320	< 10
„ 35 A	80	0	80	640	640	< 10
„ 35 B	80	0	80	320	640	< 10
S. kirkee	320	0	0	160	160	640

Die Zahlen geben die Agglutinations-Titer an.

gen, das bei den Pneumokokken in der Kapsel und bei S. kirkee im Körper sitzt. Benutzte man nämlich an Stelle des Kapsel-Serum 35 ein Serum, das mit der kapsellosen 35-Kultur (der sogenannten R-Form) hergestellt war, so kam es nicht zur Agglutination von S. kirkee. Mit dem Verlust der Kapsel, der künstlich durch Züchtung im homologen Immuns-erum herbeigeführt wurde, war auch das auf S. kirkee über-greifende Antigen verschwunden (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2.
Ergebnisse der Reagensglas-Agglutination.

Kultur	Serum Pn. 35 S-Form						Serum Pn. 35 R-Form					
	20	40	80	160	320	640	20	40	80	160	320	640
Pn. 35 S	++	++	++	++	+	—	—	—	—	—	—	—
„ „ R	+	±	—	—	—	—	++	++	++	++	++	+
S. kirkee	++	++	++	++	+	—	—	—	—	—	—	—

Zeichenerklärung: ++ und + = starke, mit bloßem Auge ablesbare Agglutination. ± = schwache, nur mit der Lupe (6 fach) erkennbare Agglutination. — = negativ.

Dass die *S. kirkee*-Agglutination eine Körperagglutination ist, geht schon daraus hervor, dass eine Alkohol-Suspension zur Agglutination benutzt wurde, und dass der Agglutinationstypus körnig war.

Zusammenfassung.

Zwischen den verschiedenen Pneumokokken- und Salmonella-Typen bestehen im allgemeinen keine oder nur sehr geringe Antigenbeziehungen. Eine Ausnahme hiervon bilden die Pneumokokken-Seren der 35-Gruppe (35, 35 A und 35 B), die *S. kirkee* stark agglutinieren. Diese übergreifenden Reaktionen beruhen wahrscheinlich auf gemeinsamen Partialantigenen, die bei den Pneumokokken-Typen in der Kapsel und bei den Salmonella-Bakterien im Körper enthalten sind.

LITERATUR.

- Kauffmann, F., M. Bjørneboe und B. Vammen: Z. Hyg. 424, 36, 1938.*
 — *E. Mørch und K. Schmith: J. of Immunology 39, 397, 1940.*

ÜBER DAS SOG. MYOBLASTENMYOM MIT BESCHREIBUNG 7 NEUER FÄLLE.

Von *Nils Ringertz*,
Privatdozent.

(Eingegangen bei der Redaktion am 4. August 1941).

Nachdem *Abrikossoff* im Jahre 1926 diejenigen Gebilde beschrieben hatte, welche er für von embryonalen Muskelzellen, den Myoblasten, ausgehende Myome hielt, haben diese im Schrifttum den Gegenstand recht erheblicher Aufmerksamkeit gebildet. *Gray* und *Gruenfeld* konnten 1937 in ihre Literaturzusammenstellung 77 Fälle aufnehmen. Obwohl sich die meisten Autoren der Ansicht *Abrikossoffs* anschliessen, dass es sich um geschwulstartige, von Myoblasten ausgehende Gebilde handelt, ist doch verschiedentlich Zweifel hieran laut geworden, und man kann sich keineswegs auf den Standpunkt stellen, das Wesen des »Myoblastenmyoms« sei endgültig geklärt.

Diese zuerst von *Abrikossoff* beschriebenen Gebilde treten meistens submukös an der Zunge auf, kommen aber auch in der Extremitätenmuskulatur, den Lippen, im Kehlkopf, in der Luftröhre, den Bronchen, der Subkutis, den Mammæ etc. vor. Sie sind ihrem Bau nach höchst charakteristisch und bestehen aus nur einer einzigen Zellart: grossen feingranulierten Elementen mit schwach basophilem Zytoplasma, welche in synzytiumähnlichen Gruppen innerhalb eines Bindegewebsstromas liegen. Die Zellkerne sind klein, ohne Polymorphismus und ohne — oder mit nur ganz wenigen — Mitosen. In denjenigen Fällen, wo sich das Gebilde an quergestreifte

Muskulatur anschliesst, kommt eine unentwirrbare Vermischung der granulierten und der Muskelzellen zustande, und es wird angegeben, dass in solchen Fällen einzelne granulierten Zellen eine streifige Zeichnung aufweisen; ebenso sind auch Bilder beschrieben worden, welche, wie man meinte, auf einen direkten Übergang zwischen quergestreiften Muskelzellen und granulierten Zellen hindeuteten. Die Gebilde sind meistens nicht abgekapselt. Sie wachsen langsam, rezidivieren ganz selten und setzen niemals Metastasen.

In seiner zweiten Veröffentlichung über diese Tumoren, 1931, stellt *Abrikossoff* 4 histologische Typen auf: a) typische, mit granulierten Zellen ohne Streifenzeichnung; b) reifende, d. h. einige Zellen weisen Längs- oder Querstreifung auf; c) hypertrophische, d. h. mit sehr grossen granulierten Zellen, aber sonst typisch; d) Myeloblastensarkome, d. h. bösartig wuchernde polymorphzellige Geschwülste, welche man mit den Rhabdomyosarkomen vergleichen kann.

Die Hinzufügung der vierten Gruppe ist bemerkenswert. *Abrikossoff* hat selbst keinen zu dieser Gruppe gehörenden Fall beobachtet, will aber eine Bestätigung seiner Anschauung in einem von *r. Meyenburg* beschriebenen sarkomatösen Zungentumor erblicken, welcher von dem letzteren Forscher den *Abrikossoffschen* Myoblastenmyomen angereicht wird. Auch im späteren Schrifttum sind unter den Bezeichnungen: »Myoblastenmyome«, »Myoblastome« oder »Rhabdomyome« Sarkome beschrieben worden, welche granulierten oder gestreifte Zellelemente enthielten, und die betreffenden Autoren wollten diese Geschwulstart als das von *Abrikossoff* supponierte bösartige Gegenstück zu den typischen sog. Myoblastenmyomen einordnen. Bei Prüfung der Beschreibungen und Mikrophotographien von diesen Tumoren findet man indessen, dass dieselben keinerlei Ähnlichkeit mit den charakteristischen *Abrikossoffschen* Gebilden aufweisen. Einige sind offensichtlich myogene Sarkome, andere Sarkome von nicht nachweislich myogenem Charakter. Es erscheint mir nicht als berechtigt, lediglich aus dem Umstand, dass einige Zellen in diesen Geschwülsten ein granuliertes Zytoplasma haben, auf eine Zusammengehörigkeit mit den typischen Gebilden *Abrikossoffs* zu schliessen, und zwar ganz besonders deshalb, weil der allgemeine Charakter ein völlig anderer ist, und ein einen wirklichen Übergang von den sog. Myoblastenmyomen zu diesen Sarkomen verkörpernder Fall offenbar nicht existiert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Analyse der eigentlichen *Abrikossoffschen* sog. Myoblastenmyome, welche zu den Gruppen a, b und c in der Darstellung dieses Autors vom Jahre 1931 gehören.

Mein Untersuchungsmaterial besteht aus 11 Fällen, welche aus dem pathologisch-anatomischen Routinematerial verschiedener Krankenhäuser in Stockholm stammen, die meisten aus dem Radiumhemmet.^{*)} Vier der Fälle sind in einer Arbeit von *Frenckner* aus dem Jahre 1938 angeführt, die übrigen sind bisher nicht veröffentlicht worden. Um mir weitere Aufklärungen über die anatomischen und histologischen Eigenschaften dieser Gebilde zu verschaffen habe ich das zugängliche Schrifttum durchgesehen. Die Beschreibung von Einzelheiten der bisher unveröffentlichten 7 Fälle meines Untersuchungsmaterials findet man auf S. 152 ff. Dort wird auch ein Bauchmuskeltumor im einzelnen geschildert, welcher bei *Frenckners* Fall 3 gleichzeitig mit dem Lippentumor vorhanden war, aber von diesem Autor nicht erwähnt wird.

Bei der Zusammenstellung der Literaturfälle hat es sich als notwendig erwiesen, an Hand des Textes und der reproduzierten Mikrophographien zu kontrollieren, dass es sich wirklich um die typischen *Abrikossoffschen* Gebilde gehandelt hat, da — wie bereits oben erwähnt wurde — in vielen Fällen sarkomatöse, m. E. nicht hierher gehörende Geschwülste mit den einschlägigen in einen Topf geworfen worden sind. Aus diesem Grunde habe ich folgende Fälle ausgeschlossen: *Meyenburgs* (1929), *Constantino-Montpellierts* (1931), *Glasunows* Fall 2 (1933), *Geschelins* (1934), *Morpurgos* Fall 2 und 3 (1935), *La Mannas* sämtliche Fälle (1935), *Cappell-Montgomerys* sämtliche Fälle (1937), *Lois* (1938) und *v. Bahrs* (1938). Bei *Imperatoris* Fall (1933) ist die Beschreibung gar zu kurzgefasst und die Mikrophotographie nicht deutlich genug, um einen sicheren Begriff vom Wesen des Gebildes zu vermitteln; ich möchte für das Wahrscheinlichste halten, dass es sich um ein Rhabdomyom gehandelt hat, nicht um einen *Abrikossoff*tumor. *Frenckners* Fall 1 gehört sicher nicht hierher. Der betreffende Kehlkopftumor ist ein fibromähnliches Gebilde mit eingesprengten Zügen von degenerativ-veränderter und atrophischer quergestreifter Muskulatur, lässt aber die charakteristischen granulierten Zellen gänzlich vermissen. Eine Reihe von weiteren Fällen, welche von anderen Autoren als Myoblastenmyome aufgeführt werden (*Lino* 1928, *Becker* 1929, *Parreira-Almeida* 1931, *Martinez* 1935, *Hegerman* 1937 und *Szathmary* 1937) habe ich nicht kontrollieren können, da mir die Originalarbeiten nicht zur Ver-

^{*)} Herrn Prof. Dr. O. Reuterwall, Chef des Radiopathologischen Instituts, danke ich hiermit für die freundliche Überlassung dieser Fälle.

fügung standen. Doch halte ich den zugänglichen Angaben nach für wahrscheinlich, dass es sich bei der Mehrzahl derselben um sarkomatöse, nicht hierher gehörende Geschwülste gehandelt hat.

Einschliesslich der von mir untersuchten sowie zweier Fälle (Heurtaux 1881 und Moschcowitz 1922), welche unter anderen Bezeichnungen vor dem Erscheinen der Abrikossoffschen Arbeit beschrieben worden waren, beträgt die Anzahl der sicheren Fälle von Myoblastom in dieser Zusammenstellung 77. Dazu kommen indessen noch mindestens 24 Fälle, welche verschiedene Autoren erwähnen, ohne sie zu beschreiben. Hierbei soll auf einen Fall von *Geschickter* besonders hingewiesen werden, welcher angeblich Metastasen gesetzt hat; in Ermangelung einer Beschreibung kann man indessen diesen Fall nicht als *Abrikossofftumor* anerkennen.

Geschlechts- und Altersverteilung der Myoblastenmyome.

Von 71 Patienten mit angegebenem Geschlecht waren 39 Männer und 32 Frauen. Das männliche Geschlecht überwiegt bei Lokalisation an der Zunge (23 Männer, 15 Frauen), Lippe (3 : 0) und am Stimmband (6 : 1).

Die Altersverteilung geht aus dem beigefügten Dekadenschema hervor (Abb. 1). Die Verteilung ist eine gleichmässige, mit der Hauptmenge der Fälle zwischen 20 und 60 Jahren, ohne deutlichen Unterschied zwischen Männern und Frauen. In den 4 Fällen, welche Neugeborene betrafen, handelte es

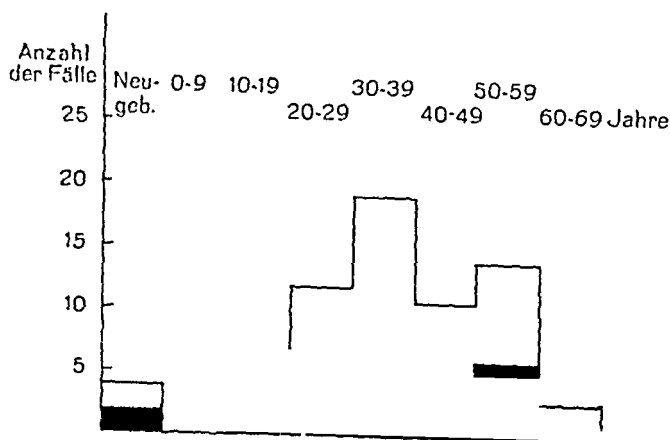


Abb. 1.
Altersverteilung bei 66 Fällen (Frauen schwarz).



Abb. 2.

Zwei Zungentumoren mit typischer Lokalisation (links Fall 3, rechts Fall 4).

sich stets um polypenähnliche Geschwülste des Oberkiefers, sog. kongenitale Epuliden (weiteres hierüber s. u.!).

Lokalisation und grobanatomischer Bau.

In etwa der Hälfte der Fälle war der Tumor an der Zunge lokalisiert und lag da stets dicht unter der Schleimhaut, niemals ganz im Innern der Muskulatur. Die häufigste Lokalisation scheint der seitliche Zungenrand zu sein (Abb. 2). In 5 Fällen wird angegeben, dass die Geschwulst am Zungenrücken sass, entweder lateral (*Dewey, Roffo 1932, Ringertz' Fall 3, Abb. 2*) oder in der Mittellinie (*Keynes, Glazunow*). In zwei Fällen wird die Zungenspitze als Lokalisation bezeichnet (*Berner, Frenckners Fall 5*). Die Grösse der Zungentumoren am Zeitpunkt der Exstirpation schwankte zwischen höchstens Haselnuss- oder Kirschgrösse und der einer Linse oder eines Pfefferkorns. Die Geschwülste waren meistens rundlich und wölbten die Schleimhaut kuppelförmig vor, in einigen Fällen waren sie plateauförmig erhaben. Der Schleimhautüberzug war zumeist glatt; einige Male sah man makroskopisch eine papilläre Epithelhyperplasie und in einigen wenigen Fällen

Tab. 1.

Lokalisation von Myoblastenmyomen.

Zunge	40 (+ 4)*
Lippe	3 (+ 1)
Processus alveolaris maxillae	4 (+ 6)
Mundboden oder Regio parapharyngealis	3
Stimmband	7
Trachea oder Bronchus	2
Oesophagus	1
Skelettmuskulatur	3 (+ 5)
Haut	11 (+ 4)
Mamma	4 (+ 2)
Vulva	1
	<hr/>
	79 (+ 22)

eine oberflächliche Exulzeration. Laut Angaben waren die Geschwülste hart und wirkten gut abgegrenzt. Die frische Schnittfläche war eben, heller als die Zungenmuskulatur und graurot oder leicht gelblich.

Die Lippentumoren lagen dicht unter der roten Lippen-schleimhaut (ein Mal an der Oberlippe, 2 Male an der Unterlippe). Der grösste derselben mass bei der Operation $10 \times 10 \times 13$ cm.

Die vom Alveolarfortsatz des Oberkiefers ausgehenden Geschwülste nehmen insofern eine Sonderstellung ein, als sie in sämtlichen bekannten Fällen kongenitale Bildungen waren. Bei denjenigen Fällen, wo die Lage genau bezeichnet worden ist, sassen sie stets vorn, bei einem der Schneidezähne. Die Tumoren sahen wie mehr oder weniger breit aufsitzende, an der Aussen- oder Innenseite des Alveolarfortsatzes hängende Polypen aus. Der grösste beschriebene (*R. Meyer*) mass $4 \times 6 \times 9$ cm, zwei andere waren kastanien- bzw. mandelgross. Es wird angegeben, dass der Tumor in einigen der Fälle ein bedrohliches Atmungshindernis für das Kind gebildet habe. Die Geschwülste waren mit glatter, gespannter Schleimhaut überzogen. Im Gewebe derselben fand man Ödem und Blutungen.

*) Die in Klammern gesetzten Zahlen geben im Schrifttum erwähnte, aber nicht beschriebene Fälle an.

Tab. 2.
Zungentumoren.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Heurtaux 1881		♀ 19 J.	2 Jahre		»Dégénérescence granulo-protéique des fibres musculaires«. Kann durch die Abb. identifiziert werden.	
Moschcowitz 1922		♂ 30 J.	einige Monate	1 cm im Durchm.	»Xanthelasma of the tongue«. Resultat der Fettfärbung wird nicht erwähnt. Kann durch die Abb. identifiziert werden.	
Abrikossoff 1926	1	♂ erw.	kurze Zeit	Form unregelm. 0,8 × 0,5 cm	Typisches Bild. Wächst dicht unter dem Epithel. Vereinzelte granulierte Zellen werden als quergestreift aufgefasst. Fettfärbg. neg.	
	3	♂ 25 J.	langsam wachsend		Typisches Bild. Wächst dicht unter d. Epithel. Ganz wenige granulierte Zellen weisen angehl. Querstreifung auf.	Rezidiv 3 Mon. n. d. Operation
	5	♂ erw.		0,5 cm im Durchm.	Typisches Bild. Wächst dicht unter dem Epithel. Mässige Epithelhyperplasie. Atrophische Muskulatur in der Umgebung. Keine Querstreifung.	
Keynes 1926		♂ 26 J.	6—9 Mon.	Zungenrücken i. d. Mittellinie, 0,5 cm im Durchm.	Typisch. Wächst dicht unter d. Epithel. Mässige Epithelproliferation. Spezialfärbungen werden nicht erwähnt. Keine Streifung.	

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Diss 1927		♂ 59 J.	weniger als 3 Mon. Syphilitiker	erbsengross. Ausserdem Leukoplakia linguae.	Wächst dicht unter dem Epithel, welches Hyperkeratose u. entz. Infiltrate i. d. Submukosa aufweist. Granulierte Zellen angebl. azidophil. Übergangsbilder v. quergestreiften u. granul. Zellen.	Rezidiv n. 3 Jahren
Dewey 1927		♀ 42 J.		Zungenrücken vorn links, 1,5 cm im Durchm.	Typisch. Wächst dicht unt. d. Epithel. Blutungen im Tumor. Degeneration i. d. umgeb. Muskulatur. Fettreaktion im subepithelialen Teil d. Tumors schw. pos. Lipoidfärbg. neg.	
Klinge 1928	1	♀ 36 J.			Alle Fälle typisch. Wachsen dicht unt. d. Epithel. Bei Fall 1 atypische Epithelproliferation, ähnl. Plattenepithelca. Keine Abkapselung, feines Bindegewebsstroma. In d. Umgeb. Bilder von Muskelregeneration mit Riesenzellen. Nur Trugbilder v. Querstreifung in gran. Zellen. Fett- u. Glykogenfärbg. neg.	
	2					
	3					
Rolfo 1928		♀ 16 J.	1 Jahr, vielleicht Trauma	rechter Zungenrand, haselnußgr.	Typisch. Wächst dicht unt. d. Epithel. Mässige Epithelprolif. Fett- oder Glykogenfärbg. nicht erwähnt.	
Jaulin u. Grand- claude 1929		♀ 42 J.	mehrere Mon. Syphilitiker	Zungenrand, erbsengr. Syphilit. Glossit.	Wächst dicht unt. d. Epithel, welches atrophisch ist. Gran. Zellen azidophil. Angebl. Übergg. v. gran. u. quergestreift. Zellen.	

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Diss 1930		♂ 38 J.	nicht angegeben	Mitte d. Zungenrückens. Pastillenform, 7 mm im Durchm.	Wächst dicht unt. d. Epithel. Starke Epithelhyperplasie. Gran. Zellen angebl. azidophil. Keine Übergangsbilder.	
Abrikossoff 1931	1	♂ 37 J.	2 Mon.	0,3 × 0,5 cm	Wächst dicht unt. d. Epithel. Mäss. Epithelhyperplasie. Muskelatrophie i. d. Umgeb. Keine Querstreifg.	
Berner 1931		♂ jung, erw.	2 Jahre	Zungenspitze, linsengross.	Wächst dicht unt. d. Epithel. Feines Stroma. Keine Streifg. Fettfärbg. neg.	
Ceelen 1931	1	♂ 50 J.	3—4 Jahre	0,75 cm im Durchm.	Wächst dicht unt. d. Epithel. Starke atypische Epithelproliferation. Muskelregeneration i. d. Umgeb. mit Riesenzellen. »Karyomitosen«.	
Derman u. Colbert 1931	1	♂ 40 J.	1 Jahr Reibg. v. kariös. Zahn?	linker Zungenrand, 0,8 × 1,3 × 0,4 cm.	Wächst dicht unt. d. Epithel, welches im Zentrum d. Tum. atrophisch, an d. Rändern desselb. hyperplastisch ist. Übergg. v. gran. u. quergestr. Zellen, Mitosen an d. Übergangsstellen. Unter den Tumorzellen vielkernige Elemente, ähnl. Muskelriesenzellen.	
	3	♀ 32 J.			Wächst dicht unt. d. Epithel, welches hyperplastisch ist. Vercinzelte Übergänge gran.-quergestr. Zellen. Mitosen.	

Autor. Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Meyer, R. 1932	3	♂ 69 J.	3 Wochen	rechter Zungenrand, 1 cm v. d. Spitze. 4 × 8 mm.	Wächst dicht unt. d. Epithel. Übergänge gran-quergestr. Zellen.	
Roffo 1932		♂ 31 J.	3 Jahre, Trauma?	rechte Hälfte d. Zungenrückens, mandelgross.	Wächst dicht unt. d. Epithel, welches mäss. Prolif. aufweist. Der Prozess wird als degenerativ aufgefasst. »Myolysis«.	
Schirmer 1932		♂ 36 J.	7 Wochen; Reizung d. plombierten Zahn	rechter Zungenrand, nusskerngr.	Wächst dicht unt. d. Epithel. Atypische Ep.-Prolif., als Kankroid gedeutet. Fettfärg. neg., Oxydase neg. Körnchen bei Bielschowskyfärbg. braunschwarz. Keine Querstreifg.	
Glazunow 1933	1	♂ 32 J.	4 Mon.	Mittellinie d. Zunge, 1 cm im Durchm.	Wächst dicht unt. d. Epithel, welches mäss. Prolif. aufweist. Regenerationsbilder i. d. umgeb. Muskulatur. Fettfärbg. neg. Keine Querstreifg.	
Klemperer 1934	4	♂ 40 J.	6 Mon.	erbsengross	Wächst dicht unt. d. Epithel. Mäss. Epithelprolif. Fettfärbg. neg. Keine Querstreifg.	
Gander 1935		♀ 52 J.	6 Mon.	rechter Zungenrand, linsengross	Wächst dicht unt. d. Epithel. Übergg. gran-quergestr. Zellen, doch »brücker« Übergg.	
Morpurgo 1935	1	♀ 54 J.		Zungenrand nahe Spitze, 5—7 mm im Durchm.	Wächst dicht unt. d. Epithel. Fett-, Lipoid- u. Glykogenfärbg. neg. Keine quergestr. Zellen.	

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Seiffert 1935		♀ 47 J.	mehrere Monate	linker Zungenrand, 1/2erbsengr.	Gibt an, dass Aussehen mit Abrikossoffs Fall 1/1926 übereinstimmt. Keine eigene Beschreibung.	
Lattes 1936		♂ 49 J.	1 Jahr	rechter Zungenrand, 1 cm v. d. Spitze. Erbsengross.	Wächst dicht unt. d. Epithel. Ziempl. grobes Bindegew.-stroma. Keine Übergänge gran.-quergestr. Zellen.	
Bang 1937		♀ 63 J.	2 Jahre	linker Zungenrand, bohnergross.	Wächst dicht unt. d. Epithel. Feines Bindegew.-stroma. Atrophie in umgeb. Muskulatur. Angebl. Übergangsbilder zwischen gestr. u. gran. Zellen.	5 Jahre nachbeobachtet.
Gray u. Gruenfeld 1937	1	♀ 30 J.	5 Mon.	vord. Teil d. Zunge. Haselnussgross.	Wächst dicht unt. d. Epithel. Übergänge gran.-quergestr. Z. Nach Ansicht d. Autoren besteht kein genügender Grund, die Tumorzellen mit embryonalen Myoblasten gleichzustellen.	
	2	♂ 35 J.	6 Mon.	linker Zungenrand, 6 mm im Durchm.	do. do.	
	4	♀ 30 J.	1 1/2 J.	erbsengross.	do. do.	
Frenckner 1938	4	♀ 22 J.	3—4 Jahre	rechter Zungenrand, erbsengross.	Wächst dicht unt. d. Epithel. Mäss. Epithelhyperplasie. Fettfärbg. neg. Nilblausulf.-färbg.	
	5	♂ 48 J.	1 Mon. starker Raucher, Alkoholiker.	Zungenspitze, erbsengross.	Wächst nur i. d. Submukosa dicht unt. d. Epithel. Hat keinen Kontakt mit d. Muskulatur. Typisches Zellbild. (Abb. 4).	2 1/2 Jahre nachbeob.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Dustin 1939		♂ ca. 30 J.			Kann durch Mikrophotographie identifiziert werden, keine Beschreibg. Wächst dicht unt. d. Epithel.	
Eickhoff 1939		♂ 25 J.		kirschgross.	Wächst dicht unt. d. Epithel, welches kanzerös proliferiert. Typisches Bild. Farbreaktionen der Granula: Scharlach, Sudan, Nilblau, Oxydase sämtlich neg. Bielschowsky: dunkelbraun-schwarze Färbg. Keine Querstreifg. Feines Bindegewebsstroma.	
Ringertz 1941	1	♂ 35 J.	längere Zeit	vord. Teil d. Zungenrandes, erbsengross.	siehe Text S. 41.	
	3	♀ 56 J.	3 Jahre	Zungenrücken, ½ cm vom Rande. 1 cm im Durchm., 3—4 mm dick.	Karzinomähnliche kollaterale Epithelproliferation. Siehe auch Text S. 43.	2 Jahre nachbeob.
	4	♀ 46 J.	4 Mon.	Zungenrand, pfefferkorngross.	siehe Text S. 44.	1½ Jahr nachbeob.
	5	♂ 54 J.	1 Jahr	Zungenrand, reichl. erbsengross.	siehe Text S. 45.	6 Wochen nachbeob.

Dazu kommen:

Im Schrifttum erwähnte Fälle: Peyron, 2 Fälle (Diskussion zu Diss), Ghon, mehrere Fälle (Diskussion zu Klinge), Geschickter 1 Fall.

Fälle, welche ich nicht nachprüfen konnte: Pareira u. de Almeida, 2 Fälle.

Martinez, 1 Fall

(von Gray u. Gruenfeld aufgenommen).

Tab. 3.
Lippentumoren.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Abrikossoff 1926	4	♂ erw.	rasches Wachsen	Oberlippe, 1 cm in Durchm.	Oberflächenepithel ulzeriert. Der oberflächliche Teil d. Tumors unter dem Epithel wird von einem entzündl. infiltr. Bindegew.-stroma durchsetzt. Fettfärbg. neg. Keine Querstreifg. Kein normal. Muskelgew. im Zus.hang m. d. Tumor.	
Frenckner 1938	3	♂ 41 J.	3 Jahre	Innenseite d. Unterlippe, 10 × 10 × 13 mm.	Wächst dicht unt. d. Lippen Schleimhaut. Stellenweise starke Epithelhyperplasie. Infiltriert die Lippenmuskulatur in der Tiefe (Abb. 5).	
	NB. gleichzeitig ähnlicher Tumor in der Bauchmuskulatur!					
Ringertz 1941	2	♂ 51 J.	2½ Mon.	Unterlippe 4 mm im Durchm.	siehe Text S. 42.	2¾ J. nachbeob.

Dazu kommt ein im Schrifttum von Geschickter erwähnter Fall.

Die in der Mundbodengegend befindlichen Tumoren waren hühnerei- und faustgrosse, stark gelappte, gut abgegrenzte Gebilde, welche den Ramus horizontalis oder Angulus mandibulae umgaben. Längs der Aussenfläche derselben verliefen Züge von Muskelfaserbündeln. Nur zwei derartige Fälle sind beschrieben (*Abrikossoff* 1931), und diese weichen angeblich durch ihre sehr grossen Zellen von dem typischen Bilde der Myoblastenmyome ab.

Fräsdorff (1939) beschrieb einen Fall von doppelseitigen Tumoren in der Parapharyngealregion (gänse- bzw. haselnussgross). Auch diese Geschwülste waren makroskopisch ge-

Tab. 4.
Mundboden- und Parapharyngealtumoren.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Abrikossoff 1931	6	♂ 36 J.	1 Jahr	Faustgrosser, stark gelappter Tumor, welcher den Ramus horizontalis mandibulae umschliesst. Reste von Muskelfasern an der Aussenseite des Tumors.	Grosszellig, (Zellen $40-60 \times 160-200 \mu$) Tumorzellen teils gekörnt, teils vakuolisiert. Teile der Zellen längs- u. quergestreift. Fettfärbg. neg. Glykogenfärbg. teilweise pos.	
	7	♂ 55 J.	10 Jahre	Hühnereigross, hinter d. Angulus mandibulae, sich in die Mundhöhle vorwölbend.	Zellgrösse $35-45 \mu$. Sonst wie Fall 6.	
Fräsdorff 1939		♂ 68 J.	18 Jahre	Parapharyngealregion, an beid. Seiten. Ein fast gänseeigrosser, ein haselnussgrosser Tumor (Obduktion).	Autor hält den Fall für mit Abrikossoffs Fall 6 u. 7/1931 vergleichbar. Granulierte, polygonale, spindel- oder bandförmige Zellen, nicht so gross wie bei A.s. Fällen. Fettfärbg. in vereinzelt Zellen pos. Kleine Glykogenkörnchen in anderen. Keine Streifung.	

Tab. 5.
»Kongenitale Epuliden«.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Volkmann 1929		♀ neugeb.		Kastanien-grosser, gestielter, von der Innenseite d. Proc. alveol. max. ausgehender Tumor am 1. Dens incisiv.	Angebl. Abrikossoffs Zungentumoren ähnlich. Keine Beschreibg. von Einzelheiten. Fettfärbg. neg.	
Ceelen 1931	2	♀ 8 Tage	angeborener Tumor.	Proc. alveolar. maxillae.	Der Tumor wächst dicht unt. d. gedehnten Oberflächenepithel. Grosse gran. Zellen ohne Fett oder Glykogen, keine Querstreifg. Vereinzelte »Karyomitosen«; Stroma teilw. hyalin, teilweise verfettet.	
(Lauches Fall)	4	neugeb.		Breitgestielter, mandelgr. v. d. Vorderseite d. Proc. alv. max. rechts v. d. Mittellinie ausgeh. Tumor.	Wie der vorige Fall, doch mit »zellreicher« und blutkapillarenreicher Zwischensubstanz.	kürzer Zeit nach beob. gute Heilg. Op.-wund
Meyer, R. 1932	1	neugeb.		Innenseite d. Proc. alv. max., gestielter Tumor, 4 × 6 × 9 cm, hing zum Munde heraus; Erstikungsgefahr.	Wie Ceelens Fall, doch mit spärli. Stroma und Gefässthrombose, Blutung u. regressiven Zellveränderungen. Fett- u. Glykogenfärbg. neg., keine Streifg.	1 Jahr 8½ Mo nach beob.

Dazu kommen:

Im Schrifttum erwähnte Fälle: Abrikossoff, 5 Fälle (einschl. eines Falles von Korickij),

Sternberg, 1 Fall.

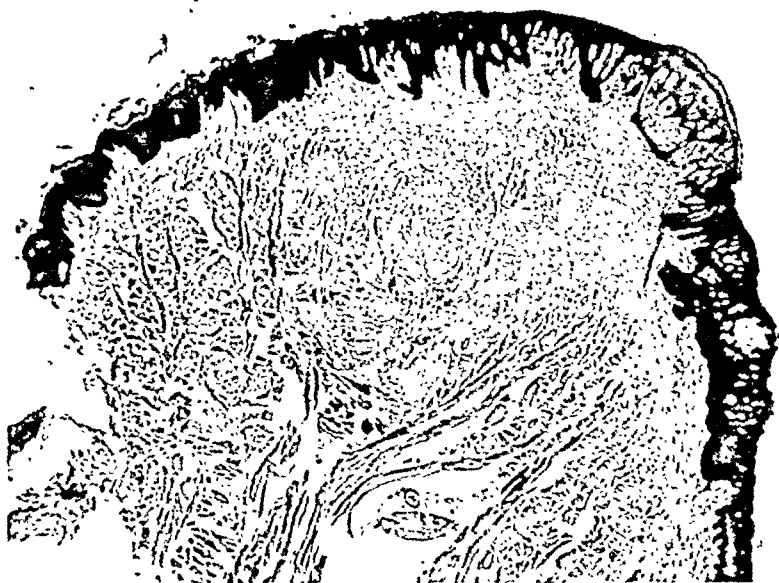


Abb. 3.

Übersichtsbild eines grosseren in der Submukosa wachsenden und die Muskulatur infiltrierenden Zungentumors (Fall 1, Htx-Eosin).

lappt und wiesen ein mikroskopisches Bild auf, welches nach Ansicht des Autors mit den beiden soeben erwähnten *Abrikossoff*schen Fällen vergleichbar war.

Die laryngealen Myoblastome gehen stets von den Stimmbändern aus und stellen polypöse, meistens erbsengrosse Gebilde mit einem Durchmesser von bis 1 cm dar. Sie haben in der Regel eine glatte Oberfläche und graurote Farbe. Exulzeration wird nicht angegeben.

Die beobachtete intratracheale Geschwulst (*Frenckners* Fall 2) bestand aus einem reichlich haselnussgrossen Gebilde, welches aus der hinteren Wand in der Höhe des 2.—3. Knorpelringes vorsprang. *Kramer* hat eine breit aufsitzende, gestielte Geschwulst an der hinteren medialen Wand des zum Unterlappen der rechten Lunge verlaufenden Hauptbronchus beschrieben, welche eine Bronchostenose und Atelektase hervorrief. *Abrikossoff* erwähnte ein Myoblastenmyom im oberen

Tab. 6.
Stimmbandtumoren.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Abrikossoff 1931	3	♂ 24 J.		hinteres Drittel d. rech. Stimmbandes; klein-erbsen-gross.	Stark atypische Plattenepithelproliferation, als Krebs gedeutet. Der Tumor wächst dicht unt. d. Epithel. Keine Abkapselung. Grobes, weitmaschiges Stroma, feine Balken zwischen kleinen Zellgruppen. Keine normale Muskulatur in der Nähe. Fettreaktion neg. Keine quergestr. Zellen.	
Dawydow 1931		♂ 30 J.	1 Jahr	hinterer-mittlerer Teil d. rech. Stimmbandes, Erbsengross.	Wird als typisches Myoblastenmyom n. Abrikossoff beschrieben. Keine Spezialfärbungen.	
Derman u. Golbert 1931	2	♂ 30 J.	1 Jahr	rech. Stimmband, linsengross.	Atypische Proliferation d. Oberflächenepithels. Keine quergestr. Zellen.	
Kleinfeld 1934		♂ 50 J.	2 Jahre	zw. vord. u. mittl. Drittel d. link. Stimmbandes, 1 cm im Durchm.	Starke Proliferation d. Oberflächenepithels. Der Tumor wächst dicht unter demselben Keine Querstreifg.	
Klemperer 1934	3	♂ 50 J.	2 Jahre	rech. Stimmband, 1 cm im Durchm.	Mässige Epithelproliferation. D. Tumor wächst dicht unt. d. Epithel. Keine Abkapselung. Feines Stroma. Fettfärbg. neg.	

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Kernan u. Cracovaner 1935		♀ 21 J.	3 Mon.	hint. zwei Drittel d. link. Stimmrds.	Lebhafte Epithelproliferation, »simulating« Plattenepithelca. Der Tumor wächst dicht unt. d. Epithel. Keine Muskelfasern zw. d. Tumorzellen.	Ca. 3 Mon. nachbeob.
Bobbio 1936		♂ 33 J.		link. Stimmrds. Hanfkorngrösse.	Stark atypische Plattenepithelproliferation, als Karzinom gedeutet. D. Tumor wächst dicht unt. d. Epithel. Keine Querstreifg.	

Tab. 7.
Tracheal- und Bronchaltumoren.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Freneckner 1938	2	♀ 28 J.	1 Jahr	hintere Trachealwand in Höhe des 2.-3. Knorpelringes. Reichl. haselnußgr.	Wächst in die Submukosa hinauf, nicht dicht unt. d. Epithel. Typisches Zellbild. Meist feines Stroma. Keine Muskulatur in d. Nähe d. Tumors.	3 Jahre nachbeob.
Kramer 1939		♀ 15 J.	14 Wochen	hintere mediale Wand d. rech. Unterlappenbronchus. Gestielt, breit aufsitzend, den Bronchus ausfüllend.	Pathologische Diagnose von Klemperer gestellt. Nicht beschrieben. Kann aus Mikrophotographie identifiziert werden.	5 Mon. nachbeob.



Abb. 4.

Kleiner sich auf die Submukosa beschränkender Zungentumor. Bei a die oberflächlichsten Zungenmuskel-Bündel (Frenckners Fall 5, Htx-v. Gieson).

Teil der Speiseröhre, das in der Submukosa lag und durch eine Bindegewebsschicht sowohl vom Schleimhautepithel wie von der Muskulatur getrennt wurde.

Es gibt im Schrifttum nur zwei eingehender beschriebene Fälle von Myoblastenmyomen der Skelettmuskulatur (Abrikossoffs Fall 2, 1926, und Klemperers Fall 6). Beide Geschwülste lagen in die Wadenmuskulatur eingebettet, waren gross (6×10 cm, $7\frac{1}{2}$ cm im Durchmesser), gut abgegrenzt, aber nicht fibrös abgekapselt, und wiesen eine fleischige, blassbraune Schnittfläche auf. Dazu kommt ein von mir untersuchter Tumor in der Scheide des M. rectus abdominis (der Patient hatte gleichzeitig ein Myoblastenmyom an der Lippe = Frenckners Fall 3). Die Bauchmuskelschwulst war rund, gut abgegrenzt, aber nicht abgekapselt, und hatte einen Durchmesser von etwa 2 cm. Geschickter erwähnt ausserdem 5 Fälle mit Tumoren »in der Extremitätenmuskulatur«.

Tab. 8.
Oesophagustumor.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Abrikossoff 1931	5	♀ 29 J.	Nebenbefund bei Obduktion	oberer Oesophagus, Hinterseite	D. Tumor wächst nicht dicht unt. d. Epithel, liegt ohne deutliche Abkapselung in der Submukosa. Mässig reichl. Bindegewebsstroma. Keine gestreiften Zellen.	

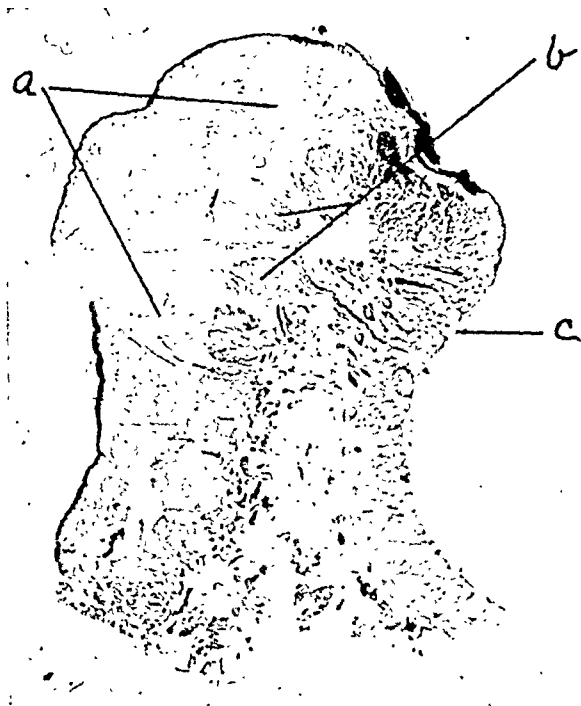


Abb. 5.

Übersichtsbild eines Lippentumors. Vertikalschnitt durch die Lippe. Die ganze schwach gefärbte Partie bei a ist der Tumor. Zwei quergetroffene Bündel von Lippenmuskulatur (bei b) sind durch granuläre Zellen infiltriert. Bei c äussere Haut der Lippe (Frenckners Fall 3, Häggqvistfärbg.).

Tab. 9.
Skelettmuskeltumoren.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Abrikossoff 1926	2	♀ 30 J.	1 Jahr	in die Wadenmuskulatur eingebettet. Länglicher Tumor, 6 × 10 cm.	Keine deutliche Bindegewebskapsel. In der Umgeb. atrophische Muskulatur mit relativer Kernvermehrung. Stellenweise reichliches Bindegew.-stroma. Fettfärbg. neg. Keine Muskelfasern innen im Tum. Keine Streifung.	
Klemperer 1934	6	♀ 42 J.	12 Jahre	in die Wadenmuskulatur eingebettet. 7½ cm im Durchm. Makrosk. fleischig, blassbraun.	D. Tumor ist teilweise fibrös abgekapselt, vermischt sich nirgends mit d. umgeb. Muskel. Vereinzelte Mitosen. Zieml. grosse hyperchromatische Kerne. Fettfärbg. neg. Wird als »early myoblastic« bezeichnet.	
Ringertz 1941 Frenckner 1938	3	♂ 41 J.		in die Rectus-scheide eingebettet; etwa 2 cm im Durchm.	siehe Text.	
NB. Pat. hatte gleichzeitig einen von Frenckner beschriebenen Lippentumor; der Bauchtumor wird in Frenckners Veröffentlichung nicht erwähnt.						

Dazu kommen:

5 im Schrifttum von Geschickter erwähnte Fälle (sin Extremitätenmuskeln).

Die in der Haut lokalisierten Myoblastenmyome lagen an verschiedenen Teilen des Rumpfes (namentlich in der Bauch- und Beckengegend) sowie in an den Rumpf grenzenden Kör-

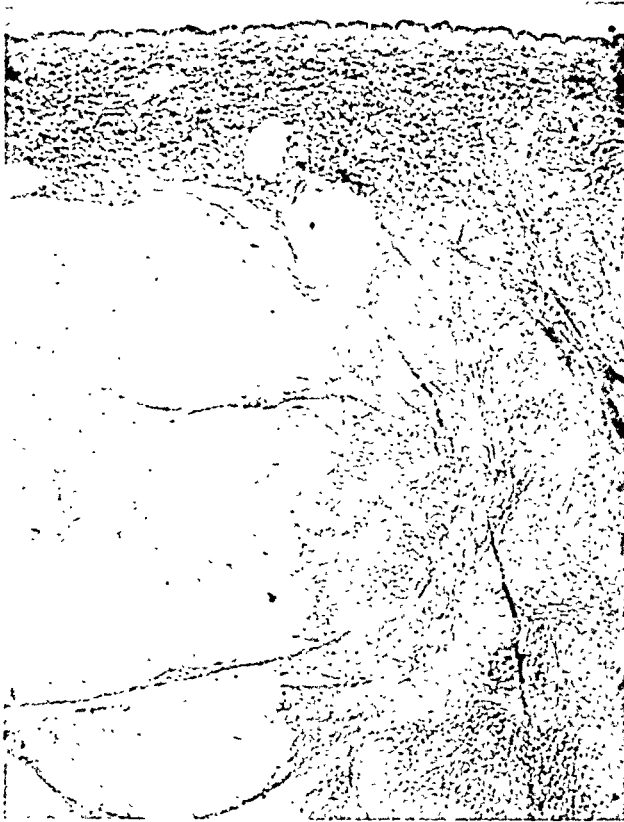


Abb. 6.

Rand eines subkutanen Bauchtumors in schwacher Vergrößerung. Die granulierten Zellen mischen sich mit den Fettzellen und strahlen längs der Bindegewebssepta aus (Fall 6, Finchers Silberimprägnation).

pertheilen, wie Supraklavikularregion, Oberarm, Leistengegend und Oberschenkel. Nur bei einem Fall (mein Fall 7) war der Tumor peripher an einer Extremität lokalisiert (Unterarm in der Nähe des Handgelenks). Die Grösse wechselte zwischen der einer Pflaume und der eines Kirschkerns. Die Geschwülste

Tab. 10.
Subkutistumoren.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Klinge 1926	4			Regio supra-clavicularis.	Wachsen dicht unt. d. Epithel der Epidermis. Keine deutliche Abkapselung, keine normale Muskulatur in der Nähe des Tumors. Geschwulstzellen polygonal, langgestreckt oder spindelförmig, in Bündel geordnet. Keine Querstreifg. Fettfärbg. neg.	
	5			Oberschenkel.		
Abrikossoff 1931	2	♂ 21 J.	1 Jahr	Oberarm, 1,5 cm im Durchm.	Wächst dicht unt. d. Epithel d. Epidermis, welches in der Mitte des Tumors atrophisch und in der Randzone hyperplastisch ist. Stroma aus grobem Bindegewebe, feine Balken zwischen den Zellgruppen. Keine Abkapselung. Keine normale Muskulatur im oder am Tumor. Keine gestreiften Zellen.	
Celeen 1931	3	♀	1½ Jahre	Beckengegend, taubeneigr.	Wächst in der Subkutis nahe an der Epidermis. Reichliches Bindegewebsstroma, keine Abkapselung. Atrophische Integumente im Tumor. Kein Muskel in der Nähe. Tumorzellen rund oder fadenförmig, auch verzweigt. Grosse Kerne, auch Rieskerne. Keine Streifung.	

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Klemperer 1934	1	♂ 58 J.	20 Jahre	Leiste. Pekanussgr.	Tumor abgekapselt, mit zieml. reichl. Bindegew.-stroma. Keine deutliche Querstreifg. (doch manchmal Querreihen von Granula). Fettfärbg. neg.	8 Mon. nachbeob.
	2	♀ 23 J.	1 Jahr	2 Tumoren, in d. Bauchhaut u. in d. Regio suprapubica; pflaumen- bzw. »marble«-gross.	Tumoren abgekapselt. Fettfärbg. neg. Keine Streifung.	2 Jahre nachbeob.
	5	♂ 41 J.	Viele Jahre	Oberschenkel, kirschkerngross.	Wächst dicht unt. d. Epidermis, unten vom subkutanen Fett abgegrenzt. Spärliches Stroma. Mässige Epithelproliferation. Keine Streifg.	
Gray u. Gruenfeld 1937	3	♀ 55 J.	Lange Zeit	Brusthaut unt. d. Mama; 15 mm im Durchm.	Abgekapselt, alveoläres Bindegew.-stroma. Drüsengänge in d. Kapsel. Keine gestreift. Zellen. Fettfärbg. neg.	
Ringertz 1941	6	♀ 59 J.	1 Jahr	linke Bauchseite.	siehe Text S. 46.	
	7	♂ 39 J.	1½ Jahre	Volarseite d. Unterarms; holnengross.	siehe Text S. 47.	

Dazu kommen:

Im Schrifttum erwähnt: Fischer Wasels, 2 Fälle ohne Angabe der Lage (Diskussion zu Klinge).

Geschickter, 2 Fälle (Sakralregion); über zwei weitere Fälle desselben Autors, einer in der Sakralregion mit Metastasen und einer an der Ohrmuschel siehe Text.

Tab. 11.
Mammatumoren.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Abrikossoff 1931	4	♀ 55 J.	2 Mon.	linke Mamma, 2 × 1,5 cm.	Nicht dicht an der Haut. Nicht abgekapselt. Zellen oft in Bündeln. Keine Streifg. Fettfärbg. neg. Rundzelleninfiltrate peripher.	
Meyer R. 1932	2	♀ 23 J.	Nicht angegeben. Gravidamens. III	linke Mamma, nussgross.	Nicht dicht unt. d. Epidermis. Bindegew.-kapsel, welche jedoch von Tumorzellen durchwachsen wird. Grobes Bindegew.-stroma. Bilder von Auflösung der gran. Zellen. Fett- u. Glykogenfärbg. neg. Keine Streifg.	6 1/2 Mon. nachbeob.
Geschickter 1934					Keine Beschreibg. Kann durch reproduzierte Mikrophotographie identifiziert werden.	
Gray u. Gruenfeld 1937	5	♀		Mamma, 10 cm im Durchm., gräuliche Farbe.	Alveoläres Stroma, feine Kapsel. »Cell arrangement suggestive of glandular tubules.«	

Dazu kommen: Im Schrifttum erwähnt: Geschickter, 2 Fälle.

Tab. 12.
Vulvatumor.

Autor, Jahr	Fall Nr.	Geschlecht, Alter	Dauer d. Anamnese	Lage, Grösse	mikroskopischer Befund	weiterer Verlauf
Holle 1941		♀ 24 J.		hinterer Teil. Wurde klinisch für eine Bartholinitis gehalten. $3,5 \times 2,5 \times 2$ cm.	Liegt in der Submukosa. Abgekapselt. Grobmaschiges grobes Stroma sowie feine Bälkchen zwischen den Zellgruppen. Die Zellen sind in alveolären Haufen oder perlschnurähnlichen Reihen angeordnet. Fettfärbg. neg. Die gran. Zellen färben sich bei Feyrter's Thioninfärbg. metachromatisch.	

lagen stets in der Subkutis nahe an der Epidermis. Die an den Extremitäten befindlichen Tumoren sollen angeblich bis dicht an die Epidermis heran wachsen, während von gewissen, am Rumpf lokalisierten Tumoren berichtet wird, dass sie in wenig enger Beziehung zur Epidermis standen, und von anderen, dass sie in der Subkutis abgekapselt waren. Der von mir beobachtete Bauchtumor lag ohne Abkapselung im subkutanen Bauchfett und erstreckte sich aufwärts bis zum tiefen Teil des Coriums.

Die exakte Lage derjenigen Tumoren, von welchen angegeben wird, dass sie in der Mamma lokalisiert waren, lässt sich schwer aus den Aufsätzen herauslesen. Wahrscheinlich lagen sie in keinem Fall dicht unter der Haut, sondern im Mammafett oder in das Drüsenparenchym eingesprengt. Angeblich waren sie meistens nicht deutlich abgekapselt. Einer der Mammatumoren hatte bei der Operation eine Grösse von nicht weniger als 10 cm im Durchmesser erreicht (Gray-Gruenfeld, Fall 5) — das grösste Myoblastenmyom, über welches ich Angaben finden konnte.

Was schliesslich den von *Holle* beschriebenen Tumor in der Vulva betrifft, so wölbte sich dieser im hinteren Seitenteil des Introitus vor und wurde klinisch für eine Bartholinitis gehalten. Der Tumor war abgekapselt, sass submukös und mass $3,5 \times 2,5 \times 2$ cm.

Mikroskopische Struktur.

Die Gebilde, von welchen hier die Rede ist, bestehen aus Zellen mit einem charakteristischen Aussehen. Diese sind protoplasma-reich und haben ein intensiv feingranuliertes Zytoplasma. Die Zellen besitzen eine starke Tendenz, sich dicht aneinander zu legen, wobei sie Gruppen bilden, welche den Eindruck von Synzytien machen; man kann in einer solchen Gruppe bis etwa 15 Kerne zählen. Bei starker Vergrösserung und geeigneter Färbung kann man jedoch sehen, dass diese Gruppen wenigstens teilweise durch äusserst feine Membranen in Fächer eingeteilt werden, welche einen oder zwei Kerne enthalten (Abb. 7). Die einzelnen Zellen haben einen Durchmesser von $15-40\mu$, die synzytiumähnlichen Zellgruppen können 5- bis 6mal so gross sein.

Die Kerne sind klein ($4-10\mu$), rund oder oval, wenig polymorph, mässig chromatinreich und enthalten ein deutliches Kernkörperchen. In meinem Material waren nie Mitosen zu sehen; gewisse Autoren (*Celeen*, *Derman-Golbert*) geben das Vorkommen von »Karyomitosen« an.

Die Granula, welche das Zytoplasma anfüllen, sind zumeist sehr klein, unter 1μ . Sie sind öfters etwa gleichgross und gleichmässig verteilt, aber in einer Reihe von Zellen treten granulafreie, optisch leere Felder auf (möglicherweise Kunstprodukte infolge der Fixierungsschrumpfung). Die Granula färben sich mit Eosin sehr schwach rosa und mit pikrinsäurehaltigen Farbmischungen schwach gelblich. Die meisten Untersucher charakterisieren sie als schwach basophil, nur die französischen Autoren (*Diss*, *Jaulin-Grandclaude*, *Gander*) bezeichnen dieselben als azidophil, da sich das Zytoplasma in Massons Trichrom schwach rot färbt. Bei der Modifikation der Mallorymethode, welche ich angewendet habe (*Ladewig*), werden sie blass-graurot. Mit der Häggqvistschen regressiven Methode färben sich die Granula blass-graublau. Bei Verwendung dieser Methode und ebenso bei der *Ladewigschen* Färbung treten im Zellzytoplasma häufig, aber bei weitem nicht immer, grössere, bis $6-7\mu$ grosse, hyaline Kugeln auf, welche von einer schmalen, optisch leeren Zone umgeben werden (Abb. 8). Diese Kugeln — wahrscheinlich Konglomerate von Granula — sind bei der *Ladewigschen*

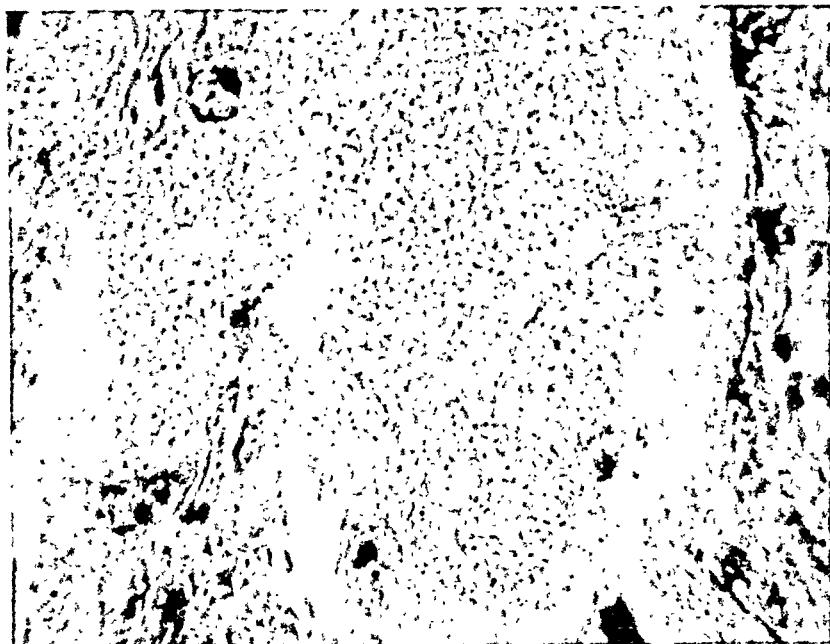


Abb. 7.

Stück einer synzytiumähnlichen Gruppe granulierter Zellen in sehr starker Vergrößerung. Die Grenzen zwischen den einzelnen Elementen sind schwach sichtbar (Fall 2, Ladewigfärbg. Vergr. ca. 1200fach).

Farbung rosa, bei der Häggqvistschen graublau. Bei der Silberimpragnierung kam in meinem Material nur selten eine schwache und äusserst feindisperse Silberpräzipitation im Zytoplasma zustande (Farbung nach Fincher sowie Laidlows Bielschowskymodifikation). Zwei ältere Untersucher (*Schirmer*, *Eikhoff*) geben an, dass die Körnchen bei Bielschowskyfarbung braunschwarz werden. Ferner behauptet *Holle*, dass die Granula bei Thioninfärbung nach Feyrter Metachromasie aufweisen, woraus er den Schluss zieht, dass Schleim in den Zellen vorkomme. Da die Schnitte bei der Feyrterschen Methode nach der Thioninfärbung nicht absoluten Alkohol passieren, kann man den Verdacht hegen, dass die von *Holle* nachgewiesene Metachromasie eine falsche solche ist. Ich habe mein Material mittels der Toluidinblaufärbung nach *Sylén* untersucht und niemals auch nur eine Andeutung von Metachromasie in den granulierten Zellen gefunden; das Zytoplasma enthält daher jedenfalls keine Esterschweifelsäure. Sehr wichtig ist selbstverständlich



Abb. 8.

Einzelheit der Grenzpartie in Abb. 6. Man sieht eine Gruppe von granulierten Zellen zwischen Fettzellen. Die dunkleren Klumpen sind Zellkerne, die helleren Granulakonglomerate (Ladewigfärbg.).

die Untersuchung des Gehalts der granulierten Zellen an Fett, Lipoiden und Glykogen. In meinem Material konnten Gefrierschnitte von 3 Fällen mit Sudanrot untersucht werden, sämtlich mit negativem Ergebnis. Bei den 66 übrigen Fällen aus dem Schrifttum, welche ich durchgesehen habe, liegen bei 30 Angaben über Färbung mit Sudan oder Scharlach vor. Bei allen bis auf zwei war das Resultat negativ; die beiden Ausnahmen sind, dass *Dewey* bei seinem Fall eine leicht positive Reaktion angibt und *Fräsdorff* bei dem von ihm beschriebenen, dass vereinzelte Zellen fetthaltig waren. Färbung mit Nilblausulfat ergab in meinem Material sowohl bei Gefrier- wie Paraffinschnitten negative Resultate. Der einzige, welcher früher diesbezügliche Untersuchungen vorgenommen hatte, *Dewey*, gibt dasselbe an. Glykogenfärbung ist, da sie primär alkoholfixiertes Material erfordert, nur in wenigen Fällen ausgeführt worden. Keiner von meinen Fällen konnte hierauf untersucht werden, und von den 66 Literaturfällen sind nur 9 untersucht worden. Von diesen haben 7 gänzlich negative Ergebnisse geliefert, während bei *Abri-*

Kossoffs Fall 6 (1931) Glykogen nachgewiesen werden konnte, und bei *Fräsdorffs* Fall sehr wenig kleine Glykogenkörnchen. Zu bemerken ist, dass diese Fälle 2 von den 3 Fällen darstellen, welche eine Variante der typischen »Myoblastenmyome« bilden (*Abrikossoffs* Gruppe c, vgl. oben).

Die oben angeführte Schilderung der Mikrochemie der granulierten Zellen lässt sich dahingehend zusammenfassen, dass die Granula aus Eiweisskörpern ohne Gehalt an Esterschwefelsäuren, ohne Beimischung von Fett (in der grossen Mehrzahl der Fälle) oder von färbereich nachweisbaren Lipoiden und meistens ohne Glykogengehalt bestehen.

Die granulierten Zellen oder synzytiumähnlichen Zellgruppen liegen in ein Stroma eingebettet, von dem man sagen kann, dass es nach dem Milieu ausgestaltet ist, in welchem die Zellen wachsen. Wenn die Zellen in einer Submukosa wachsen, z. B. bei Tumoren in der Zunge, Lippe und dem Stimmband, werden Zellen oder Zellgruppen von runder oder ovaler Form von feinen oder gröberen kollagenen Bindegewebszügen mit spärlichen elastischen Fasern umrahmt. Die Zellgruppen wachsen weit in die Papillenschicht hinein, bis dicht an die Basalmembran des Epithels. In den subkutanen Tumoren wachsen die Zellgruppen in gewissen Fällen dicht unter der Epidermis (*Abrikossoffs* Fall 2, 1931, *Klinges* Fall 4 und 5, *Klemperers* Fall 5, mein Fall 7), während in anderen Gruppen von granulierten Zellen nur die tiefe Schicht des Coriums infiltrieren. So verhält es sich z. B. bei meinem Fall 6. Dieser Tumor lag grösstenteils im subkutanen Fettgewebe und hatte ein ziemlich grobes Bindegewebsstroma, dessen periphere Ausläufer in diejenigen Bindegewebszüge übergingen, welche das Fettgewebe in Lappchen einteilen (Abb. 6). Die Geschwülste lassen in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle Kapselbildung vermissen. Gruppen granulierter Zellen springen zwischen die Fasern des angrenzenden submukösen oder subkutanen Bindegewebes vor und gehen ohne sichtbare Grenzen in ihre Umgebung über. Bei meinem Fall 6 verschmelzen sie in der Peripherie mit dem subkutanen Fettgewebe (Abb. 6 und 8). Bei gewissen in der Literatur beschriebenen Fällen wird jedoch eine Abkapselung angegeben, welche mehr oder weniger ausgeprägt ist. Es handelt sich hierbei um 4 subkutane Tumoren, einige der Geschwülste in der Mamma und *Holles* Fall von Vulvatumor.

Von speziellem Interesse ist die Untersuchung der Sachlage bei den Fällen, wo die granulierten Zellen in enge Beziehung zu quergestreifter Muskulatur treten. Dies ist bei den Geschwülsten in der Zunge, Lippe und den wenigen Beispielen von Skelettmuskel Tumoren der Fall. Bei keinem Fall mit anderer Lokalisation wird angegeben, dass sich quergestreifte Muskulatur dicht am Tumor be-



Abb. 9.

Stück aus der Mittelpartie eines Zungentumors. Granulierte, in Bündeln angeordnete Zellen, welche durch Atrophie ausgefallene Muskelfaserbündel ersetzen (Fall 3, Ladewigfärbg.).

fand. In bezug auf die Zungen- und Lippengeschwülste ist zu betonen, dass dieselben in sämtlichen Fällen in der Submukosa dicht unter dem Epithel wuchsen — also in keinem Falle lediglich im Innern der Muskulatur. Ferner gibt es in dem von mir untersuchten Material zwei kleine Tumoren (mein Fall 2 und *Frenckners* Fall 5), welche sich gänzlich auf die Submukosa beschränkten und keine Verbindung mit der Muskulatur erkennen liessen.

Wendet man sich den grösseren Zungentumoren zu, so findet man, dass die oberflächliche Zone derselben innerhalb der Submukosa liegt, während sich die Hauptmasse im Innern der Zungenmuskulatur befindet, oder, richtiger ausgedrückt, in einem Gebiet, wo vorher Zungenmuskulatur vorhanden gewesen war. Im mittleren Teil der Geschwülste findet man somit Massen von dicht zusammengepressten granulierten Zellen, welche durch feine Stromazüge voneinander getrennt werden. Die Zellen zeigen hier eine mehr oder weniger deutliche Anordnung zu langgestreckten Gruppen, welche einander kreuzende Bündel bilden (Abb. 9). Diese Bündel enthalten vereinzelt schmale, atrophische Muskelfasern. Im



Abb. 10.

Stück von der tiefen Grenze eines Zungentumors. Granulierte Zellen infiltrieren die Interstitien der Muskelfaserbündel (Frenckners Fall 4, Häggqvistfärbg.).

tiefen Teil des Tumors nimmt der Gehalt an Muskelfasern in Bündeln zu, und die Muskelzellen werden weniger atrophisch. An der unteren Grenze schliesslich hat man das Bild von Muskelfaserbündeln mit normalen Muskelzellen vor sich, die interstitiell von Reihen granulierter Zellen infiltriert werden, welche sich peripherwärts verlieren (Abb. 10). Das Bild deutet also darauf hin, dass die granulierten Zellen das interstitielle Gewebe der Zungenmuskelbündel infiltrieren und in demselben Masse, wie sie an Zahl und Grösse zunehmen, die Muskelfasern auseinanderdrängen und eine Atrophie derselben bewirken. Peripherwärts vom Tumor wurden in der Zungenmuskulatur bei meinem Material niemals Anzeichen von Degeneration oder Atrophie angetroffen; ebensowenig sah man Regenerationsbilder. Ältere Autoren geben indessen eine derartige Atrophie bei einigen Fällen von Zungentumor an (Abrikossoff, Fall 5/1926 und Fall 1/1931, Bang). Auch Bilder von Muskelregeneration sollen angeblich vorkommen (Klinge, Celcen, Fall 1, Derman-Golbert, Fall 1, Glasunow).

Die innige Vermischung von granulierten Zellen und quergestreiften Muskelfasern, welcher man demnach in diesen Zungengeschwülsten begegnet, erschwert bisweilen die Unterscheidung der beiden Zellarten. *Abrikossoff* glaubte in zwei Zungentumoren bei gewissen der granulierten Zellen eine Querstreifung nachweisen zu können. Eine ganze Reihe jüngerer Autoren bestätigen dies (stets mit Bezug auf Zungentumoren) und beschreiben sogar Bilder eines Übergangs zwischen quergestreiften Muskelfasern und granulierten Zellen (*Diss, Jaulin-Grandclaude, Derman-Golbert, Meyer, Bang, Gray-Gruenfeld*). Andererseits gibt es Forscher, welche auf dem Standpunkt stehen, dass die Streifung und der Eindruck eines Übergangs nur Trugbilder seien (*Klinge, Schirmer*). Quergestreifte Zellen kamen laut Angabe ausserdem bei *Abrikossoffs* beiden Fällen von »gross-zelligem« Tumor in der Unterkiefergegend (Fall 6 und 7/1931) vor, aber diese sind die beiden einzigen im Schrifttum geschilderten Geschwülste ausserhalb der Zunge, bei welchen quergestreifte Zellen beschrieben werden. Gestreifte Zellen sind also auch bei den beiden Fällen von »Myoblastenmyom« in der Wadenmuskulatur (*Abrikossoff, Klemperer*) nicht nachgewiesen worden. Bei diesen Fällen treten die granulierten Zellen nicht in nahe Berührung mit den Muskelfasern, sondern werden durch eine Bindegewebszone von den letzteren getrennt. In dem Bauchmuskeltumor, welchen ich untersucht habe, besteht jedoch an einer Stelle eine Vermischung von granulierten Zellen und Muskelfasern, wobei die letzteren Anzeichen von Atrophie und auch Regenerationsbilder aufweisen. Da die Frage der Übergangsbilder für die Deutung dieser sog. Myoblastenmyome von grosser Bedeutung ist, habe ich in meinem Material die betreffenden Bilder eingehend studiert und bin zu der bestimmten Ansicht gekommen, dass es sich immer um Trugbilder handelt. Die Bilder kommen dort vor, wo ein von granulierten Zellen stark infiltriertes Muskelfaserbündel schräg geschnitten ist (Abb. 11), und wenn man Immersionsvergrösserung und eine Färbung anwendet, bei der die Myofibrillen gut hervortreten (z. B. nach *Ladewig*), sieht man, dass die letzteren stets quer abgeschnitten sind. In einer Zellpartie, in welcher man bei schwächerer Vergrösserung sowohl Myofibrillen wie Granula zu sehen glaubt, findet man bei starker Vergrösserung, dass die beiden Elemente niemals in derselben Ebene liegen, sondern dass es sich offensichtlich um eine Überlagerung infolge von Schrägschnitt handelt.

Bei solchen Tumoren, wo die granulierten Zellen in einer Submukosa dicht unter dem Epithel wachsen, nämlich in der Zunge, Lippe und im Stimmband, wird in einer erheblichen Anzahl von Fällen eine mehr oder weniger atypische Wucherung des Oberflächenepithels zwischen die granulierten Zellen herab beobachtet.

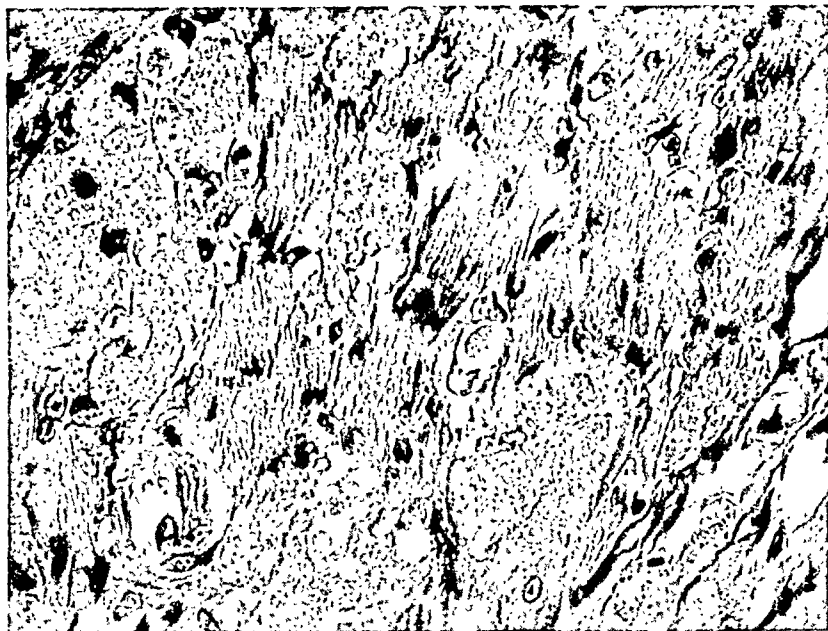


Abb. 11.

Partie aus dem Grenzgebiet eines Zungentumors. Ein schräggetroffenes Muskelfaserbündel wird von granulierten Zellen infiltriert. Die Myofibrillen sind an der Grenze zu den granulierten Zellen scharf abgeschnitten (Fall 3, Ladewigfärbg.).

Die Proliferation ist mitunter so stark, dass sie von verschiedenen Autoren als karzinomatös bezeichnet wird. So wird bei 40 Zungentumoren Epithelwucherung in 14 Fällen verzeichnet; diese wird in 8 Fällen mässig, in 2 Fällen stark atypisch und in 4 Fällen krebsähnlich genannt. Unter den 4 zuletzt erwähnten Fällen befindet sich ein von mir untersuchter (Abb. 12). Einer der 3 bekannten Lippentumoren wies mässige Proliferation auf. Von 7 bekannten Stimmbandgeschwülsten zeigten nicht weniger als 6 eine derartige Wucherung; 3 der Autoren bezeichnen den Prozess als Karzinom. Die Epithelproliferation scheint sich stets auf das Gebiet zu beschränken, wo die granulierten Zellen mit dem Epithel in Kontakt treten und hört am Oberflächenrande des Tumors vollständig auf. Bei einigen von mir beobachteten Fällen war sie nur in der Mitte der Submukosapartie des Tumors vorhanden. Die Proliferation ist sehr kleinkolbig, mit augenscheinlich freiliegenden Epithelverbänden, welche oft Hornperlen enthalten. Die Zellen in diesen

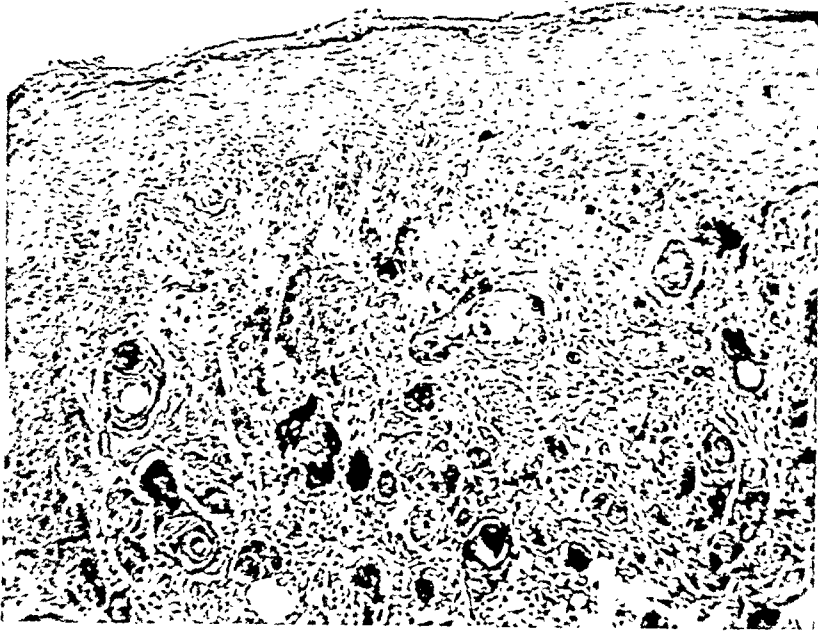


Abb. 12.

Karzinomähnliche Epithelproliferation an der Oberfläche eines Zungentumors (Fall 3, Htx.-v. Gieson).

Verbänden haben oft hochgradig polymorphe Kerne, aber Mitosen sind in meinem Material nicht nachgewiesen worden. M.E. ist man nicht berechtigt, diese Proliferation bei irgendeinem Fall als sicheres Karzinom zu deuten. Es hat sich auch bei keinem veröffentlichten Fall ergeben, dass der Patient im weiteren Verlauf ein Krebsrezidiv oder Anzeichen von Metastasen bekam.

Wachstumsgeschwindigkeit, Rezidive, ätiologische Momente.

Bei einem Versuch, auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren dadurch Rückschlüsse zu ziehen, dass man die Zeit, während welcher die Patienten das Gebilde beobachtet hatten, der Grösse desselben bei der Exstirpation gegenüberstellt, kommt man zu ziemlich wechselnden Ergebnissen. Das beruht offenbar darauf, dass die Geschwülste nur mechanische Beschwerden machen und daher bei gewissen Lokalisationen lange unbeobachtet bleiben. Die grössten Zungentumoren

(mandel- oder haselnussgrosse) hatten die Patienten meistens 3 bis 4 Jahre gemerkt, aber es gibt auch Beispiele dafür, dass sich ein haselnussgrosser Tumor nur 5 Monate und ein boh-nengrosser 3 Wochen lang fühlbar machte. Die Mehrzahl der Stimmbandgeschwülste mit einem Durchmesser von ca. 1 cm hatten 2 Jahre hindurch Heiserkeit verursacht. Von den beiden ungefähr gänsecigrossen, in der Wadenmuskulatur befindlichen Gebilden war das eine dem Patienten nur ein Jahr lang bekannt gewesen, während das andere eine 12jährige Anamnese hatte. Der allgemeine Eindruck ist, dass diese Gebilde ziemlich langsam wachsen.

Über den Verlauf nach der Entfernung des Gebildes liegen meist keine anderen Angaben vor, als dass die Wunde komplikationsfrei heilte. Doch sind 2 von den 77 Patienten 5 Jahre, 6 2—3 Jahre, 2 1—2 Jahre und 5 6 Wochen bis 9 Monate nachbeobachtet worden. Ein örtliches Rezidiv wurde nur bei 2 Patienten konstatiert, beide mit Zungentumoren (*Abrikossoff*, Fall 3/1926; *Diss*, 1927). Dasselbe trat in dem einen Falle 3 Monate, in dem anderen 3 Jahre nach der Operation auf, und in beiden Fällen liess sich feststellen, dass der ursprüngliche Tumor nicht vollständig entfernt worden war.

Mit Bezug auf eine Anzahl von Zungengeschwülsten liegen Angaben vor, dass sich die Tumoren im Kontakt mit kariösen oder plombierten Zähnen entwickelt hatten. Von Interesse ist auch, dass bei den Fällen von *Diss* und *Jaulin-Grandclaude* die Patienten Syphilitiker waren; bei jenem Fall lag eine Leukoplakia linguae vor, bei diesem eine syphilitische Glos-sitis. Bei Fällen mit nicht lingualer Lokalisation findet man keine Angaben, welche auf irgendein besonderes ätiologisches Moment hindeuten könnten.

Erörterung der Pathogenese.

Als *Abrikossoff* im Jahre 1926 5 Fälle von diesen Gebilden, in der Zunge, Lippe und Wadenmuskulatur lokalisiert, beschrieb, gab er der Anschauung Ausdruck, dass es echte, von embryonalen Muskelzellen, den Myoblasten, ausgehende Ge-

schwülste wären. Er sah ihren Entstehungsmechanismus in einem Regenerationsprozess in der quergestreiften Muskulatur, welcher unter Regression in das Embryonalstadium zur Zellproliferation führt. *Klinge*, welcher einige Jahre später ebensolche Gebilde in der Haut, also nicht im Anschluss an quergestreifte Muskulatur, beobachtete, übernahm nichtsdestoweniger die Ansicht *Abrikossoffs* über den Charakter der Gebilde als myogene Geschwülste und nahm an, dass dieselben sich auf dysontogenetischer Grundlage entwickeln. In seiner Arbeit vom Jahre 1931, in welcher *Abrikossoff* Beispiele von noch anderen Lokalisationen gibt, entwickelt er eine dualistische Anschauung über die Genese der Gebilde: Dysontogenese in bezug auf die nicht mit der Muskulatur zusammenhängenden und seine frühere Theorie der regenerativen Proliferation hinsichtlich der Zungentumoren. *Roffo* (1928 und 1932) steht auf einem ganz anderen Standpunkt. Nach ihm haben die Gebilde nicht Geschwulstcharakter und kommen durch degenerative Umwandlung von quergestreiften Muskelzellen zustande. Die grosse Mehrzahl der späteren Autoren machen die Ansicht *Abrikossoffs*, dass es sich um Myoblastengeschwülste handelt, zu der ihrigen. Diese sog. Myoblastenmyome sind demzufolge als eine Gruppe unter die übrigen Muskelgeschwülste eingereiht worden. Eine ganze Reihe von Autoren haben unter der Bezeichnung maligne Myoblastenmyome oder »Myoblastome« sarkomatöse Geschwülste mit ausgeprägtem Zellpolymorphismus beschrieben und haben dieselben den *Abrikossoffs*chen Tumoren an die Seite gestellt, da granulierte sowie — in einem Teil der Fälle — gestreifte Zellen in ihnen vorkamen. Wie hier einleitungsweise betont wurde gibt es keinen Beweis dafür, dass diese Sarkome und *Abrikossoffs* sog. Myoblastenmyome genetisch zusammengehören. Eine derartige Annahme gründet sich in erster Linie auf die Überzeugung, dass die *Abrikossoffs*chen Gebilde tatsächlich aus Myoblasten bestehen; zweitens wird bei ihr vorausgesetzt, dass die granulierten Zellen, die in solchen Sarkomen vorkommen, welche mit grösserer oder geringerer Wahrscheinlichkeit myogen sind, derartige embryo-

nale Muskelzellen sind. Fälle, welche morphologisch klare Übergangsformen zwischen den *Abrikossoff*schen Gebilden und solchen Sarkomen darstellen, habe ich im Schrifttum nicht finden können.

In späterer Zeit haben *Gray* und *Gruenfeld* angezweifelt, dass die granulierten Zellen in den *Abrikossoff*schen Gebilden ein Gegenstück der Myoblasten sind. Diese Autoren wollen zwar nicht in Zweifel ziehen, dass die Zungentumoren ihrer Genese nach in der einen oder anderen Weise myogen sind, sagen aber, dass »Myoblastenmyome« mit anderer Lokalisation eine andere Genese haben können. So sprechen ihrer Ansicht nach gewisse strukturelle Züge bei den in der Mamma lokalisierten Gebilden dafür, dass ihr Ursprung in Drüsenzellen liegt.

Die Gründe, welche dafür angeführt worden sind, dass es sich bei den »Myoblastenmyomen« um myogene Geschwülste handelt, sind zusammenfassend folgende:

1. Der enge anatomische Zusammenhang zwischen Muskelzellen und granulierten Zellen in gewissen dieser Gebilde. Hierzu wäre zu bemerken, dass diese Vermengung fast nur in Zungen- und Lippentumoren vorkommt, und auch da nicht immer. Kleine Geschwülste können ausschliesslich in der Submukosa lokalisiert sein, ohne an die Muskulatur heranzureichen. Andererseits gibt es keinen Fall von gänzlich innerhalb der Muskelmasse liegendem Zungentumor. *Abrikossoff* war der Ansicht, dass die Tumorzellen aus der Muskulatur heraus zur Submukosa hin wachsen. M. E. ist der Sachverhalt der entgegengesetzte.

2. Das Vorkommen von längs- und quergestreiften Elementen unter den granulierten Zellen sowie Übergänge zwischen quergestreiften Muskelzellen und granulierten Zellen. Diese Erscheinungen sind nur in solchen Tumoren und an denjenigen Stellen beschrieben worden, wo eine innige Vermischung von Muskelzellen und »Tumor«-Zellen bestand, niemals in einem Tumor, der keinen anatomischen Zusammenhang mit Muskulatur hatte. Meiner Ansicht nach handelt es sich stets um Trugbilder durch Überlagerung in den Schnitten.

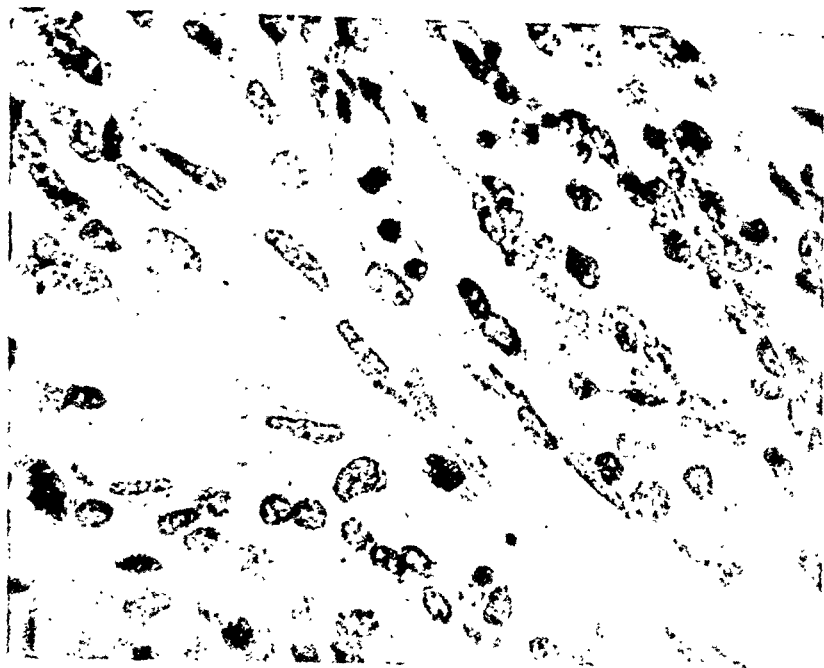


Abb. 13.

Myoblasten von einem 20 mm langen Embryo (Htx.-v. Gieson, Vergr. ca. 1200fach).

3. Die behauptete Identität der granulierten Zellen mit Myoblasten. Die diesbezügliche Annahme *Abrikossoffs* gründet sich auf die Angabe von *Godlewski*, dass die Myoblasten in einem gewissen Entwicklungsstadium synzytiale, gekörnte Massen und Stränge bilden. Spätere Untersucher bestreiten indessen das Vorkommen eines ausgeprägt gekörnten Stadiums (*Zeckel, Franz, Marcus*; zit. n. *Gray-Gruenfeld*). *Häggqvist* fand zwar in einem frühen Stadium der Myoblastenentwicklung Körnchen im Protoplasma, aber von äusserster Feinheit und färberisch schwer darstellbar. Abb. 13 zeigt Myoblasten im synzytialen Stadium aus einem Myotom eines 20 mm langen Embryos, in ungefähr derselben Vergrößerung aufgenommen wie die Zellgruppe aus einem »Myoblastenmyom« in Abb. 7. Die Ähnlichkeit ist durchaus keine auffallende.

Es kann hinzugefügt werden, dass es mit allen pathologischen Erfahrungen in Widerspruch steht, dass eine von dermassen frühembryonalen Zellelementen wie Myoblasten ausgehende Geschwulst ein morphologisch so benignes Zellbild aufweisen und biologisch so gutartig sein könnte, wie die Abrikossoffschen Gebilde.

Verf.s Ansicht nach gibt es also keinen stichhaltigen Grund dafür, dass die Abrikossoffschen Gebilde von Myoblasten ausgehende Geschwülste sein sollen. Ebensowenig existiert irgendein Beweis dafür, dass sie bei ihrer Genese überhaupt notwendigerweise etwas mit der Muskulatur zu schaffen hätten; die Analyse dieser Gebilde spricht eher dafür, dass die granulierten Zellen aus subkutanem, submukösem oder dem interstitiellen Bindegewebe der Muskulatur entstehen.

Auf die Frage des wirklichen Wesens dieser Gebilde vermag die hier vorgelegte Analyse keine bestimmte Antwort zu geben. Es kann stark bezweifelt werden, dass sie Geschwülste im eigentlichen Sinne sind; es ist aber äusserst schwierig, eindeutige Beweise dafür zu erbringen, dass ein Gebilde dieses Typs nicht eine gutartige Geschwulst ist. Das »ruhige« Zellbild mit seinem geringen Zellpolymorphismus und meistens fehlenden Mitosen macht durchaus nicht den Eindruck einer stärkeren Wachstumsenergie, was auch der klinisch blande Verlauf bestätigt. Die Gebilde wachsen ferner nicht expansiv unter Kapselbildung, wie viele gutartige Geschwülste. Die granulierten Zellen fügen sich in den Grenzgebieten plastisch zwischen Bindegewebsfasern, Fettzellen (Abb. 6 u. 8) und Muskelfasern (Abb. 10) ein. Erst nachdem ihre Menge in der Muskelinterstitien sehr beträchtlich geworden ist, üben sie eine druckatrophierende Wirkung auf die Muskelfasern aus.

Wenn sie keine wirklichen Geschwülste sind, was sind sie dann? Roffos Annahme, dass es sich um eine reine Degenerationserscheinung handelt, dürfte sich nicht halten lassen. Einerseits werden niemals Zwischenstadien von normalen Muskelzellen und granulierten Zellen beobachtet, und andererseits lassen sich doch die kutanen etc. Gebilde nicht auf

diese Weise erklären. Ferner braucht man nur den Lippen-tumor in Abb. 5 zu betrachten, um die Sinnlosigkeit des Gedankens einzusehen, dass lediglich eine Degeneration der spärlichen Muskelfaserbündel in der Lippe die Entstehung des umfangreichen tumorähnlichen Gebildes veranlassen sollte.

Eine Möglichkeit, welche sich nicht von der Hand weisen lässt, ist indessen die, dass es sich um Gebilde von derjenigen Art handeln sollte, welcher die Deutschen die äusserst treffende Bezeichnung »Speicherungstumoren« gegeben haben. Vor *Abrikossoff* sind Gebilde von wahrscheinlich dieser Art unter einer solchen Rubrik beschrieben worden, doch mit der irrigen Vorstellung, dass es sich um Fettspeicherung in den Zellen handle (»Xanthelasma of the tongue« — *Moschcowitz* 1922). In Wirklichkeit müsste hier eine auf der Grundlage irgendeiner Stoffwechselstörung entstandene Eiweiss-speicherung in Bindegewebszellen oder retikuloendothelialen Zellen vorliegen. Einen schlüssigen Beweis für diese Theorie hat jedoch die vorliegende Analyse nicht liefern können.

Kasuistik.

Fall 1.

Mann, 35 J. Hatte seit längerer Zeit einen ungefähr erbsengrossen Tumor am vorderen Teil der Zunge bemerkt. Die Geschwulst wurde poliklinisch exzidiert. Die Wunde heilte per primam.

Mikroskopische Beschreibung (Karolinisches Inst. T. 517/1924):

Das im Querschnitt ca. 5×8 mm grosse tumorähnliche Gebilde baut sich aus grossen (ungefähr $20-30 \times 40-60 \mu$) Zellen mit granuliertem Protoplasma auf, welche eine runde oder ovale Form haben. Die Hauptmasse der Zellen liegt in der Submukosa der Zunge, und die Zellen infiltrieren die Papillen bis dicht an das Oberflächen-epithel heran. Letzteres ist mässig hyperplastisch, aber ohne Anzeichen maligner Proliferation. In der Tiefe vermischen sich die granulierten Zellen mit Fasern der quergestreiften Zungenmuskulatur (Abb. 3). Die granulierten Zellen haben oft, aber nicht immer, deutliche Zellgrenzen, und werden von äusserst feinen, mit Silber imprägnierbaren Zügen getrennt. In der subepithelialen Schicht findet man auch gröbere interzelluläre Züge von kollagener Beschaffenheit. Elastische Fasern kommen zwischen den granulierten

Zellen vor, aber spärlicher als in dem umgebenden submukösen oder intermuskulären Bindegewebe. Das tumorähnliche Gebilde ist nicht abgekapselt; seitlich verlieren sich die Zellen zwischen den Zügen des submukösen Bindegewebes, in der Tiefe zwischen den Muskelfaserbündeln. Das Protoplasma der granulierten Zellen ist mit feinen (ca. $1\ \mu$) Körnchen angefüllt. Diese liegen diffus verteilt, zumeist dicht zusammengepackt, bisweilen lichter, so dass kleinere granulafreie Flächen vorkommen. Die Körnchen sind schwach basophil, bei Verwendung pikrinsäurehaltiger Farblösungen nehmen sie einen leichten Stich ins Gelbe an. Nirgends sieht man Längs- oder Querstreifung im Protoplasma. Die Zellkerne sind rund oder oval, $4\text{--}8\ \mu$ gross, mässig chromatinreich, mit einem oder mehreren Kernkörperchen. Dort, wo die Zellgrenzen deutlich sind, scheint jede Zelle einen, seltener zwei Kerne zu enthalten. Da indessen die Zellgrenzen an vielen Stellen undeutlich sind, lässt sich schwer beurteilen, ob eine grössere Kernanzahl pro Zelle vorliegt. Mitosen wurden nicht beobachtet. Im tieferen Teil des tumorähnlichen Gebildes kommt eine innige Vermengung von quergestreiften Muskelzellen und granulierten Zellen vor. Man hat manchmal den Eindruck, dass die Muskelzellen in einem Bündel von Reihen granulierter Zellen auseinander gesprengt werden. An solchen Stellen kann man bei schwächerer Vergrösserung den Eindruck erhalten, dass die quergestreiften Muskelzellen in granulierten Elemente übergehen. Bei starker Vergrösserung (Immersion) wird jedoch ersichtlich, dass Trugbilder infolge von Überlagerung in schräger Schnittrichtung vorliegen. Die Myofibrillen sind nämlich stets quer abgeschnitten und setzen sich nie zwischen die Granula hinein fort. Eingesprengt in die Hauptmasse der granulierten Zellen in der mittleren Partie des Gebildes sieht man isolierte Muskelzellen, bisweilen mit Anzeichen von Atrophie. In der Muskulatur ausserhalb des Tumors sieht man keine Merkmale von Atrophie, Degeneration oder Regeneration.

Fall 3.

Mann, 51 J. Hat seit $2\frac{1}{2}$ Monaten eine kleine Verhärtung an der Unterlippe bemerkt. In der letzten Zeit trat eine Hyperkeratose rechts dicht am Tumor auf. Ist leidenschaftlicher Raucher. *Status* am 8.3.1938: Am Lippenrot, etwa in der Mitte der Unterlippe, ein weisslicher, an der Oberfläche leicht papillomatöser Tumor, 4 mm im Durchmesser, ca. 1 mm dick (Abb. 4). Rechts von der Geschwulst eine hyperkeratotische Partie, ca. 4×7 mm gross. Klinische Diagnose: Karzinom. *Behandlung*: blutige Exzision und Spickung mit Radiumnadeln. *Weiterer Verlauf*: ein halbes Jahr später kleine Nekrose in der Narbe, welche an den Zähnen anliegt. Dann Heilung mit kleinerem Defekt. $2\frac{3}{4}$ Jahre nach der Operation erscheinungsfrei.

Mikroskopische Beschreibung (Radiumhemmet B 366/38):

Das tumorähnliche Gebilde, welches im Schnitt ca. $3 \times 1\frac{1}{2}$ mm misst, liegt in der Submukosa der Lippe, dicht unter dem Epithel. Dasselbe setzt sich aus grossen granulierten Zellen von runder, ovaler oder bandartiger Form zusammen. Die Zellen dringen aufwärts in die Papillenschicht bis dicht an die Basalmembran des Epithels vor. In der Tiefe wird das Gebilde von Fettgewebe mit eingesprengten quergestreiften Muskelfasern begrenzt. Eine Abkapselung besteht nicht; die granulierten Zellen verlieren sich im benachbarten Bindegewebe. Die Muskelfasern erstrecken sich nirgends bis zwischen die granulierten Zellen hin. Die letzteren liegen in von feinen kollagenen Bindegewebszügen ohne elastische Fasern getrennten Gruppen. An gewissen Stellen kann man die einzelnen Zellen innerhalb der Gruppe gut unterscheiden. Sie werden durch äusserst feine Züge gegeneinander abgegrenzt, welche bei Mallory- oder Silberfärbung sichtbar sind (Abb. 7). Die einzelne Zelle enthält da meistens einen, selten zwei Kerne. Oft verschmelzen jedoch die Zellen zu einer granulierten Masse mit bis zu etwa 10 Zellkernen, und man kann nur bei Immersionsvergrösserung und Malloryfärbung eine Facheinteilung angedeutet sehen. Die Zellgranula sind äusserst fein, oft kleiner als 1μ , färben sich in pikrinsäurehaltigen Farblösungen schwach gelb, bei Malloryfärbung gräulich, bei Häggqvists regressiver Methode graublau. Sie sind nicht immer gleichmässig verteilt, sondern vereinigen sich nicht selten zu hyalinen Klumpen, welche $5-6\mu$ gross werden können (fast Zellkerngrösse). Diese Klumpen werden von einer schmalen granulafreien Zone umgeben; sie werden bei Malloryfärbung rosa und bei Häggqvistfärbung blau. Nirgends eine Andeutung von Streifung in den granulierten Zellen. Die Zellkerne sind rund oder oval, $5-10\mu$ gross, mässig chromatinreich, mit gut hervortretendem Kernkörperchen.

Fall 3.

Frau, 56 J. Bemerkt seit 3 Jahren einen anfangs stecknadelkopfgrossen, im letzten Jahre rasch gewachsenen Tumor an der Oberseite der Zunge. Die Geschwulst pflegt gerötet und druckempfindlich zu werden, wenn die Patientin eine Halsentzündung hat. *Status* am 18.11.1938: links am Zungenrücken, $4-5$ cm von der Spitze, $\frac{1}{2}$ cm von der Kante entfernt ein runder, scheibenförmiger Tumor, 1 cm im Durchmesser, etwa 4 mm dick (Abb 2). Konsistenz knorpelhart, Oberfläche fein-papillomatös. *Behandlung:* blutige Exstirpation. Darauf Heilung per primam. 2 Jahre nach der Operation erscheinungsfrei.

Mikroskopische Beschreibung (Radiumhemmet B 1912/38):

Das im Schnitt ca. 8×4 cm grosse tumorähnliche Gebilde setzt sich aus grossen granulierten Zellen zusammen, welche oben bis dicht unter das Epithel der Zungenschleimhaut reichen und sich in der Tiefe mit Muskelfaserbündeln vermischen. Seitlich ist die Grenze des Tumors gegen das submuköse Bindegewebe ziemlich scharf, aber Kapselbildung liegt nicht vor. Das Epithel weist innerhalb des an die granulierten Zellen grenzenden Gebiets eine starke Proliferation mit kleinkolbigem Wachstum in die Tiefe zwischen die granulierten Zellen auf, wo man augenscheinlich frei liegende Epithelverbände, oft mit Hornperlen, findet. Die Epithelzellen zeigen keine stärkere Kernatypie, und man sieht keine Mitosen (Abb. 12). Unmittelbar an beiden Seiten des Tumors verliert das Epithel diese Tendenz zur Wucherung.

Die granulierten Zellen haben dieselbe Anordnung wie bei Fall 1. Es werden also rundliche oder handförmige Zellgruppen von einem kollagene Fasern enthaltenden Stroma umschlossen, während die einzelnen Elemente innerhalb der Gruppe durch äusserst feine Fasern voneinander geschieden werden. Oft findet man aber in den Stromafachern granuliertete Synzytien, innerhalb welcher eine Einteilung höchstens schwach angedeutet ist. In der Tiefe der Geschwulst sind Muskelzellen und granuliertete Zellen eng miteinander vermischt, und man hat den Eindruck, dass die Muskelfaserbündel von granulierten Zellen infiltriert werden, welche sich reihenweise zwischen die Muskelzellen legen; letztere weisen oft Atrophie auf. Auch in diesem Fall gibt es scheinbare Übergangsformen zwischen quergestreiften Muskelzellen und granulierten Zellen (Abb. 11). Die Analyse der Granula ergibt das bei Fall 2 beschriebene Verhalten. Die hyaline Klumpenbildung ist an gewissen Stellen besonders ausgesprochen, wo Reihen granulierter Zellen infiltrierend zwischen atrophische Muskelzellen vordringen.

Fall 4.

Frau, 46 J. Fühlte vier Monate vor der Aufnahme zufällig ein Knötchen am Zungenrand, welches nicht weiterwuchs. *Status* am 1. 2. 1939: am rechten Zungenrand ein pfefferkorngrosser, etwas erhabener, schwach rosafarbener Tumor. Derselbe hat eine glatte Oberfläche und feste Konsistenz (Abb. 2). *Behandlung*: blutige Exstirpation. *Weiterer Verlauf*: Heilung per primam. 3 Monate später Verhärtung in der Narbe. Probeexzision; pathologisch-anatomische Diagnose: Fremdkörpergranulom. $11\frac{1}{2}$ Jahre nach der ersten Operation erscheinungsfrei.

Mikroskopische Beschreibung (Radiumhemmet B 206/1939):

Das im Querschnitt ca. 3×4 mm grosse tumorähnliche Gebilde baut sich aus grossen granulierten Zellen von derselben Art wie bei dem vorangehenden Fall auf. Die Zellen wachsen bis dicht an das Epithel der Zunge heran. In der Tiefe mischen sich die Zellen unter die oberflächlichen Züge der Zungenmuskulatur, an den Seiten verschmelzen Gruppen von Zellen zwischen Faserbündeln des Submukosabindgewebes. Das Oberflächenepithel der Zunge weist über der Mittelpartie des Tumors eine erhebliche kleinkolbige Proliferation zwischen die granulierten Zellen herab auf, mit anscheinend frei liegenden kleinen Epithelgruppen bis 1 mm unter der Epitheloberfläche. Die Kolben enthalten zum Teil kleine Hornperlen. Das Epithel lässt keine stärkere Atypie erkennen, und Mitosen sind nicht zu beobachten.

Die granulierten Zellen weisen dieselbe Anordnung in Gruppen innerhalb eines grobmaschigen Stromas auf wie bei den vorausgehenden Fällen. Bei diesem Fall treten die sehr feinen Septa, welche die einzelnen Elemente in der Gruppe trennen, besonders gut hervor, und man erhält nur selten den Eindruck einer Synzytiumbildung. Die Zellgranula haben die oben beschriebenen Eigenschaften; die Bildung hyaliner Klumpen kommt vor, ist aber nicht besonders stark ausgesprochen. Die gleiche Vermengung von granulierten Zellen und Muskelzellen wie bei Fall 1 und 2, verstreute atrophische Muskelfasern im Innern der Hauptmasse granulierter Zellen. Keine echten Übergangsbilder. In der Muskulatur peripherwärts vom Tumor keine Anzeichen von Atrophie oder Regeneration.

Fall. 5.

Mann, 54 J. Gibt an, seit mindestens einem Jahre eine »Warze« an der Zunge zu haben, welche zeitweise oberflächlich ulzeriert gewesen ist. Während der letzten Zeit Schmerzen im Tumor. *Status* am 17. 4. 1939: am linken Zungenrand ein reichlich erbsengrosser Tumor, 3 bis 4 mm erhaben, mit einer kleinen zentralen Ulzeration. Keine Infiltration in der Umgebung. (Pat. hat auch eine Dupuytren'sche Kontraktur an der linken Hand). *Behandlung*: blutige Exstirpation nach 3tägiger präoperativer Teleradium-Behandlung. *Weiterer Verlauf*: die Operationswunde heilte glatt. Bei Nachuntersuchung 6 Wochen nach der Operation erscheinungsfrei.

Mikroskopische Beschreibung (Radiumhemmet B 761/1939):

Das tumorähnliche Gebilde misst im Schnitt etwa 4×5 mm und besteht aus grossen granulierten Zellen, welche bis dicht an das Zungenepithel heran wachsen und sich in der Tiefe mit quer-

gestreiften Muskelfaserbündeln vermengen. Das Oberflächenepithel zeigt starke Hypertrophie und das gleiche Bild kleinkolbiger Abwärtswucherung wie bei Fall 3 und 4. Hier liegt indessen noch eine oberflächliche Ulzeration und Ausbildung eines gefässreichen Granulationsgewebes vor, hauptsächlich an der einen Seite neben der Hauptmasse der granulierten Zellen. Das Stroma zwischen den letzteren ist hier etwas gröber als bei den vorangehenden Fällen. Die darunterliegende Muskulatur, ebenso wie die Muskulatur am Grunde des Granuloms, weist fibröse Durchwachsung und Atrophie einer Reihe von Muskelfasern auf. Keine Regenerationsbilder.

Die Einzelmerkmale der granulierten Zellen stimmen in allen Punkten mit den Befunden bei den obigen Fällen überein. Keine echten Übergangsbilder.

Fall 6.

Frau, 59 J. Bemerkt seit einem Jahr einen Tumor links am Bauch. *Status* am 22.5.1939: an der linken Leibseite in der Höhe des Nabels ein subkutaner, mit der Haut verwachsener, harter, rundlicher Tumor mit nicht ganz deutlichen Grenzen. Die Haut ist über demselben etwas eingezogen. Der Tumor würde, wenn er in der Mamma lokalisiert wäre, dem Palpationsbefund nach für ein Karzinom gehalten werden. *Behandlung*: blutige Exstirpation. Der Tumor war fast walnussgross, lag mit seinem Hauptteil im subkutanen Fett, gut abgegrenzt aber nicht abgekapselt, und wies eine grau gelbe Schnittfläche auf. *Weiterer Verlauf*: die Operationswunde heilte per primam. Später nicht beobachtet.

Mikroskopische Beschreibung (Radiumhemmet B 992/1939):

Das tumorähnliche Gebilde ist im Schnitt etwa 16×18 mm gross. Dasselbe liegt im tiefen Teil des Coriums und im Panniculus adiposus. Die Geschwulst besteht aus grossen granulierten Zellen, die in einem bindegewebigen Stroma liegen, welches eine direkte Fortsetzung des Coriumbindegewebes darstellt. Haufen granulierter Zellen verlieren sich im tiefen Teil des Coriums, erstrecken sich aber nicht so weit aufwärts, dass sie Haarwurzeln oder Talgdrüsen berühren. In der Tiefe liegt keine Abkapselung vor, sondern das Stroma löst sich strahlenförmig in zahlreiche schmale Züge auf, welche in die das Fettgewebe in Läppchen einteilenden Bindegewebsbalken übergehen (Abb. 6). Gruppen von Fettzellen sieht man auch tief im Innern der Hauptmasse des Tumors. Das Stroma ist grob und besteht aus kollagenen Fasern mit einem schwachen Einschlag von elastischen. Es ist im Zentrum des Gebildes am grössten, wo dichte, sehnenähnliche Balken vorhanden sind. Zwischen diesen dicken, parallelen Bindegewebsfasern liegen die gra-

nulierten Zellen in langgestreckten Haufen, welche nur unvollständig in schmale Bänder eingeteilt werden. Man hat also meistens der Eindruck bandförmiger, vielkerniger, granulierter Synzytien. Wo das Bindegewebe weniger grob und von wechselnder Faserrichtung ist, liegen die granulierten Zellen in unregelmässig geformten Haufen, welche ebenfalls meistens den Charakter von Synzytien haben. In der Peripherie des Gebildes ist das Bindegewebsstroma viel feiner und spärlicher, und hier vermischen sich Fettzellen und granulierten Zellen, indem sich Haufen oder Synzytien der letzteren plastisch zwischen die Fettzellen hineindrängen, diese bisweilen gänzlich umgebend.

Im Stroma sieht man feine und mittelgrobe Gefässe von normalem Aussehen sowie auch vereinzelte markhaltige Nerven. Im tiefen Teil des Gebildes befinden sich einzelne kleine Rundzelleninfiltrate im Bindegewebe. Quergestreifte Muskulatur ist in unmittelbarer Nähe des Tumors nicht, glatte in Gestalt von *Erectores pilorum* (doch nicht in Berührung mit der Geschwulst) sowie in den Wandungen von Gefässen vorhanden.

Die Einzelheiten der granulierten Zellen sind im wesentlichen die gleichen wie bei den vorangehenden Fällen. Man hat jedoch hier einen stärkeren Eindruck von Synzytien, da die feinen Bälkchen, welche die langgestreckten, bis zu 15—20 Kerne enthaltenden Zellhaufen in Fächer einteilen, oft nicht hervortreten. Die Ausbildung von hyalinen Klumpen macht sich stark bemerkbar. Färbung mit Sudan- und Nilblausulfat an Gefrierschnitten ist hinsichtlich der granulierten Zellen negativ. Die Zellen sind weniger pikrinophil als bei den vorausgehenden Fällen.

Fall 7.

Mann, 39 J. Bemerkte vor $1\frac{1}{2}$ Jahren einen kleinen Tumor an der Volarseite des rechten Unterarms, nahe am Handgelenk. Die Geschwulst ist im Laufe der Zeit etwas gewachsen. *Status* am 28. 2. 1941: bohnengrosser, fester, elastischer subkutaner Tumor, gegen die Unterlage verschieblich. *Behandlung*: blutige Exzision.

Mikroskopische Beschreibung (Maria-Krankenhaus T 107/1941):

Das Gebilde ist rundlich und misst im Schnitt etwa 8×9 mm. Dasselbe liegt in der Subkutis dicht unter der Epidermis und besteht aus eng zusammengepackten Gruppen von granulierten, in ein feines Stroma aus kollagenem Bindegewebe eingeschlossenen Zellen. Die Zellgruppen bilden reichlich Infiltrate in der Papillarschicht des Coriums, dicht an der Basalmembran des Epithels. Das Epidermisepithel weist innerhalb des Gebietes, welches mit dem Gebilde in Berührung steht, eine mässige Hyperkeratose sowie eine

beträchtliche grobkolbige Tiefenproliferation auf. Die Kolben enthalten oft Hornperlen, zeigen aber keine Zellatypie und keine Mitosen. Seitlich vom Tumor ist die Epidermis normal. Nach den Seiten strahlen Gruppen granulierter Zellen zwischen die Bindegewebsbalken des Coriums aus. In der Tiefe ist das Gebilde distinkter begrenzt, doch ohne Abkapselung, und auch hier lösen sich stellenweise grössere Gruppen granulierter Zellen von der Hauptmasse ab. In den Tumor sind keine Talg-, Schweißdrüsen oder Haarfollikel eingeschlossen.

Die Gruppen von granulierten Zellen ähneln Synzytien, aber es lassen sich undeutliche Zellgrenzen unterscheiden. Das färberische Verhalten der Granula ist dasselbe wie bei den übrigen Fällen. Fett- und Glykogenfärbungen konnten nicht ausgeführt werden. Die Ausbildung hyaliner Klumpen im Zytoplasma ist sehr hochgradig. Die Kerne sind klein, rund oder oval, ohne irgendwelche Atypie und ohne Mitosen.

Frenckners Fall 3, Bauchtumor:

Mann, 41 J. Hatte eine Verhärtung rechts von der Mittellinie am Bauch ungefähr ebensolange wie seinen Lippentumor bemerkt. *Status:* walnussgrosser, blassroter Tumor im rechten M. rectus abdom. unterhalb des Nabels, mit dem vorderen Blatt der Rectus-scheide verwachsen. *Behandlung:* blutige Exstirpation.

Mikroskopische Beschreibung (Karolinisches Inst. T. 433/1935):

Das Gebilde ist rundlich und misst im Schnitt etwa 14 mm im Durchmesser. Dasselbe besteht aus einem Stroma von grobfaserigem kollagenem Bindegewebe mit wechselnder Fasserichtung, in welches Gruppen granulierter Zellen eingelagert sind. Diese Gruppen sind polygonal oder langgestreckt und scheinen nach den Zwischenräumen der Bindegewebsfasern geformt zu sein. Die Zellgruppen sehen bei schwächerer Vergrösserung wie Synzytien mit vielen Kernen aus; bei Immersionsvergrösserung kann man undeutliche Grenzen zwischen einzelnen Zellen unterscheiden, welche einen oder zwei Kerne zu besitzen scheinen. Die granulierten Zellen verhalten sich färberisch wie bei den früheren Fällen. Fett- und Glykogenfärbungen konnten nicht vorgenommen werden. Die Granula sind hier und da zu hyalinen Klumpen von fast derselben Grösse wie die Zellkerne verbacken.

An der äusseren Grenze des Gebildes hört das grobe Bindegewebsstroma ziemlich abrupt auf, ohne im allgemeinen in die quergestreifte Muskulatur mit reichlich fettgewebshaltigen Interstitien auszustrahlen, welche die Umgebung bildet. Die granulierten Zellen halten sich auch innerhalb des Bindegewebsstromas. Man sieht

jedoch an einigen Stellen, dass das grobfaserige Stromabindgewebe Muskelfaserbündel infiltriert, deren Fasern da atrophisch sind und auch unregelmässig gebaute Riesenkerne sowie dichtliegende Kernhaufen aufweisen. Innerhalb solcher Gebiete kommt eine innige Vermischung von Muskelzellen und granulierten Zellen zustande, aber irgendwelche Bilder eines wirklichen Übergangs von der einen zur anderen Zellart sind nicht zu finden.

Zusammenfassung:

Die *Abrikossoffschen* sog. Myoblastenmyome wurden vom Verf. an Hand eines eigenen Materials von 7 bisher unveröffentlichten Fällen studiert, und ferner wurde das Primärmaterial bei 4 von *Frenckner* früher beschriebenen Fällen untersucht. Aus dem Schrifttum wurden weitere 66 Fälle zusammengestellt, welche nach Verf.s Ansicht sicher Gebilde von dieser Art sind. Dieses Gesamtmaterial von 77 Fällen wurde mit Bezug auf Geschlechts- und Altersverteilung (Abb. 1), makroskopische Anatomie sowie biologische Eigenschaften bearbeitet.

Verf. will nachdrücklich betonen, dass die sarkomatösen Tumoren, welche in der Literatur under der Bezeichnung »malignes Myoblastenmyom«, »Myoblastom« etc. beschrieben worden sind, nichts mit den charakteristischen *Abrikossoffschen* Geschwülsten zu tun haben. Die letzteren haben stets gutartigen Charakter.

Verf. bestreitet, dass irgendein Übergang zwischen quergestreiften Muskelzellen und den granulierten Zellen des »Myoblastenmyoms« vorkommt oder dass die granulierten Zellen eine Streifung aufweisen können. Bilder, welche in diesem Sinne gedeutet worden sind, treten in Zungen- und Lippentumoren dieser Art auf, sind aber Trugbilder, welche dort zustandekommen, wo granulierten Zellen Muskelfaserbündel interstitiell infiltrieren. Zwei vom Verf. untersuchte Fälle deuten darauf hin, dass die Zungentumoren submukös entstehen

und die Zungenmuskulatur sekundär infiltrieren, nicht umgekehrt, wie früher geltend gemacht worden war. Auf Grund des soeben angeführten und der Tatsache, dass ungefähr die Hälfte sämtlicher bekannter »Myoblastenmyome« an Stellen sassen, wo keine quergestreifte Muskulatur vorhanden ist, steht Verf. auf dem Standpunkt, dass die Annahme, diese Gebilde hätten irgendeinen genetischen Zusammenhang mit der Muskulatur, völlig unbegründet ist. Es wird auch darauf hingewiesen, dass die Angabe *Abrikossoffs*, die granulierten Zellen des »Myoblastenmyoms« seien embryonalen Myoblasten ähnlich, nicht richtig ist.

Nach Verf.s Ansicht sind also diese Gebilde nicht myogen, sondern die granulierten Zellen, aus welchen sie sich zusammensetzen, entstehen im Bindegewebe und können bei gewissen Lokalisationen die Muskulatur infiltrieren. Ob die Gebilde den Charakter wirklicher Neoplasmen haben, ist zweifelhaft; als Hypothese könnte in Betracht kommen, dass sie durch eine örtliche Störung des Proteinstoffwechsels entstehende Speichergstumoren sind.

SCHRIFTTUM.

- Abrikossoff, A.*: Über Myome, ausgehend von der quergestreiften willkürlichen Muskulatur. *Virch. Arch.* 260, 215, 1926.
 — Weitere Untersuch. über Myoblastenmyome. *Virch. Arch.* 280, 723, 1931.
v. Bahr, G.: A case of myoblastic myoma of the lacrimal sac. *Acta ophthalmologica* 16, 109, 1938.
Bang, F.: Et tilfælde av rhabdomyoma granulo-cellulare (myoblastom) i tungan. *Ugeskr. f. Læge* 99, 710, 1937.
Becker: Inaug.-diss. Kiel 1929. (zit. n. *Eickhoff*).
Berner, O.: En »ny« muskelsvulst. Et tilfelle av »myoblast-myom«. *Norsk mag. f. lægevid.* 92, 706, 1931.
Bobbio, A.: Mioblastoma ad elementi granulosi della laringe. *Arch. per. le sc. med.* 61, 583, 1936.

- Cappell, D. F. & Montgomery, G. L.*: On Rhabdomyoma and Myoblastoma. *Journ. of Path. & Bact.* 44, 517, 1937.
- Ceelen, W.*: Über Myoblastengeschwülste. *Virch. Arch.* 280, 741, 1931.
- Cioni, C.*: *Arch. ital. Anat. e Istol. pat.* 7, 484, 1936. *Ref. Zbl. f. Path.* 70, 256, 1938.
- Constantino & Montpellier*: *Bull. ass. franc. p. l'étude du cancer*, 20, 522, 1931.
- Dawydow, I.*: Zur Frage der unausgereiften Rhabdomyome des Kehlkopfes. *Zsch. f. Hals-, Nasen- u. Ohrenheilk.* 30, 221, 1931.
- Derman, G. L. & Golbert, Z. W.*: Über unreife aus der quergestreiften Muskulatur hervorgehende Myome. *Virch. Arch.* 282, 172, 1931.
- Dewey, K. W.*: Rhabdomyoma of the tongue. *Arch. of path.* 3, 645, 1927.
- Diss, A.*: Un nouveau type de tumeur musculaire: le rhabdomyome granulo-cellulaire. *Bull. de l'ass. franc. pour l'étude du cancer* 16, 863, 1927.
- Diss, A.*: Le rhabdomyome granulo-cellulaire de la langue. *Ann. d'anat. path.* 7, 1071, 1930.
- Dustin, A. P.*: A propos du myome myoblastique. *Acta Union internat. contre cancer* 4, 684, 1939.
- Eickhoff, H.*: Myoblastenmyom und Karcinom. *Virch. Arch.* 304, 432, 1939.
- Frenckner, P.*: The occurrence of so-called Myoblastomas in the mouth and upper air passages. *Acta oto-laryng.* 26, 689, 1938.
- Fräs Dorf, W.*: Zur dysontogenetischen Entstehung der »Myoblastenmyome«. *Beitr. z. path. Anat. u. allg. Path.* 102, 24, 1939.
- Gander, G.*: Du rhabdomyome granulocellulaire de la langue. *Bull. de l'ass. franc. p. l'étude du cancer* 24, 56, 1935.
- Gschelin, A. I.*: Ein Fall von Myoblastmyom des Kehlkopfs. *Acta oto-laryng.* 21, 66, 1934.
- Geschickter, C. F.*: Tumors of muscle. *Am. J. of cancer* 22, 378, 1934.
- Glasunow, M.*: Über unreife, begrenzt und destruierend wachsende Rhabdomyoblastome. *Frankf. Zschr. f. Path.* 45, 328, 1933.
- Gray, S. H. & Gruenfeld, G. E.*: Myoblastoma. *Am. J. of cancer* 30, 699, 1937.
- Hegemann, Gerd.*: Beitr. z. Kenntn. d. Myoblastenmyome. Inaug.-diss. Münster 1937. (zit. n. Eickhoff).
- Heurtaux, M.*: Tumeur de la langue (Dégénérescence granulo-proteique des fibres musculaires) *Bull. de la Soc. anat. de Nantes* 4, 98, 1881.
- Holle, G.*: Über die Deutung der sogenannten Myoblastenmyome. *Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat.* 76, 244, 1941.

- Imperator, C. J.*: Rhabdomyoma of larynx. Laryngoscope 43, 945, 1933.
- Jaulin et Grandclaude*: Un cas de rhabdomyome granuleux de la langue. Bull. de l'ass. franc. p. l'étude du cancer, 18, 395, 1929.
- Kernan, J. D. & Cracoraner, A. J.*: Rhabdomyoma of the vocal cord. Laryngoscope 45, 891, 1935.
- Keynes, G.*: Rhabdomyoma of the tongue. Brit. J. Surg. 13, 570, 1926.
- Kleinfeld, L.*: Myoblastoma of the larynx. Arch. of otolaryngology 19, 551, 1934.
- Klemperer, P.*: Myoblastoma of the striated muscle. Am. J. of Cancer 20, 324, 1934.
- Klinge, F.*: Über die sogenannten unreifen nicht quergestreiften Myoblastenmyome. Verhandl. d. Deutsch. Path. Gesellsch. 23, 376, 1928.
- Kramer, R.*: Myoblastoma of the bronchus. Ann. of otol. rhin. & laryng. 48, 1083, 1939.
- La Manna*: Über Myoblastome. Virch. Arch. 294, 663, 1935.
- Lattes, R.*: Mioblastoma ad elementi granulosi della lingua. Arch. per le sc. med. 61, 590, 1936.
- Lino*: Tumori 4, 2, 1928.
- Loi, L.*: Arch. ital. di med. sper. 3, 343, 1938.
- Martinez, E. M.*: Sobre una observación de rhabdomyoma granulocelular (Diss.) Arch. de med. intern. 1, 281, 1935. (cit. n. Gray-Gruenfeld).
- v. Meyenburg, H.*: Henke-Lubarsch, Handbuch d. spec. path. Anat. IX, 1, 8, 468, 1929.
- Meyer, R.*: Myoblastentumoren («Myoblastenmyome» Abrikossoff). Virch. Arch. 287, 55, 1933.
- Morpurgo, B.*: Mioblastomi. Arch. per le sc. med. 59, 229, 1935.
- Moschcowitz, E.*: Xanthoma (Xanthelasma) of the tongue. Proc. N. Y. Path. Soc. 22, 135, 1922.
- Parreira, H. & Nunes de Almeida, J.*: Dois casos de rhabdomyoma da lingua. Arq. de path. 6, 582, 1934. (cit. Gray-Gruenfeld).
- Roffo, H.*: Miolisis nodular de la lengua. Boletin del inst. med. exp. p. el est. del cancer 5, 237, 1928.
- Miolisis nodular de la lengua. Boletin del inst. med. exp. p. el est. del cancer 9, 489, 1932.
- Schirmer, R.*: Über ein Myoblastenmyom zusammen mit Cancroid der Zunge. Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path. 89, 613, 1932.

- Seiffert, A.:* Myoblastenmyom d. Zunge. Zsch. f. Laryngologie 26, 4, 1935.
- Szathmáry, Z.:* Magyar orvosi arch. 38, 260, 1937.
- Volkman, J.:* Eine seltene, angeborene Oberkiefergeschwulst bei einem Neugeborenen (Myoblastenmyom) Zbl. f. Chir. 56, 2982, 1929.

(AUS DEM UNIVERSITÄTSMUSEUM FÜR ALLGEMEINE
PATHOLOGIE, KOPENHAGEN.

DIREKTOR: PROF., DR. MED. K. A. JENSEN.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung von »Løvens kemiske Fabrik«,
Kopenhagen, ausgeführt).

ANWENDUNG VON MUCIN-INFEKTIONEN BEI CHEMOTHERAPEUTISCHEN UNTERSUCHUNGEN.

(VERSUCHE MIT MENINGOKOKKEN, B. COLI,
B. TYPHI UND B. PARADYSENTERIAE).

Von V. Sindbjerg-Hansen.

(Eingegangen bei der Redaktion am 24. November 1941).

Bei den Bestrebungen, die chemotherapeutische Behandlung der Infektionskrankheiten ständig auszubauen und zu verbessern, spielt der Tierversuch eine grundlegende Rolle. Neue Stoffe müssen in experimentellen Infektionen und toxiologischen Versuchen an Laboratoriumstieren genau untersucht werden, bevor sie, vorausgesetzt dass die Ergebnisse zufriedenstellend sind, der Humanmedizin zur Durchprüfung überlassen werden können. Die am häufigsten angewandten, experimentellen Infektionen sind Mäuseinfektionen mit Streptokokken und Pneumokokken, also Bakterien von hoher Mäusevirulenz, und es waren auch Infektionen mit diesen Bakterien, die zuerst zum Gegenstand chemotherapeutischer Behandlung in der Humanmedizin gemacht wurden. Da jedoch die Chemotherapie schnell ihren grossen Wert auch bei noch einer Reihe anderer Infektionskrankheiten bewies, darunter einigen, deren Bakterien so wenig pathogen für die üblichen Laboratoriumstiere waren, dass sehr beträchtliche Bakterienmengen für eine tödliche Wirkung erforderlich wurden, ent-

stand für die experimentelle Arbeit das Problem, wie man mit einer passend kleinen Menge dieser Bakterien doch den Tieren eine tödliche Infektion beibringen konnte, deren chemotherapeutische Behandlung dann zu versuchen war. Gegenüber sehr grossen Bakterienmengen könnte nämlich eine sonst effektive Chemotherapie eventuell versagen, da den Tieren dann unter Umständen soviel Bakterientoxin zugeführt wird, dass dasselbe unmittelbar tödlich wirkt, ohne dass irgendeine intravitale Vermehrung zustande zu kommen braucht.

Für mehrere in dieser Beziehung wichtige Bakterien zeigte es sich nun, dass die Methode zur »Virulenzserhöhung« mit Schweinemagenmucin, die *Nungester, Wolf & Jourdonais* sowie *Miller* unabhängig voneinander angegeben haben, brauchbar war. *Miller* hob besonders die Fähigkeit des Mucins hervor, Meningokokken für Mäuse infektiös zu machen, da selbst die intraperitoneale Injektion einer ganz geringen Bakterienmenge in Mucin eine tödliche Infektion geben konnte. Die Methode ist daher auch häufig zu chemotherapeutischen Versuchen mit Meningokokken angewandt worden, so von *Buttle, Gray & Stephenson; Proom; Rosenthal, Bauer & Branham; Whitby; Brown* u. a., und von *Long & Bliss*, die nach Untersuchung zahlreicher Präparate sogar zu der Auffassung gelangten, dass eine solche Meningokokkeninfektion ein weit empfindlicherer Prüfstein für den möglichen chemotherapeutischen Effekt eines Stoffes sei als die übliche Infektion mit hämolytischen Streptokokken. — Auch zu experimentellen Gonokokkeninfektionen ist das Mucin benutzt worden, u. a. von *Levaditi & Vaisman, Cohn & Peizer, Long & Bliss*; doch waren die Ergebnisse hier weit weniger zufriedenstellend, da immer ziemlich grosse Bakterienmengen erforderlich waren, ehe die Infektion anging. — Mit gutem Erfolg wandten *Buttle, Parish, McLeod & Stephenson* die Methode zur Infektion von Mäusen mit *Bact. typhi* und *Bact. Aertrycke* an; Behandlung der infizierten Tiere mit Sulfanilamid ergab eine gute therapeutische Wirkung. *Fisk* erzeugte ebenfalls tödliche Typhusinfektionen mit Hilfe von Mucin und konnte die Mäuse mit sowohl Sulfanilamid, Sulfapyridin, Uliron als auch Sulfa-

methyllthiazol beschützen. *Rist & Thibault* nahmen Mucininfektionen mit *B. paradysenteriae* Flexner und *B. alkalescens* vor und sahen auch bei diesen Infektionen eine gute Wirkung von Sulfanilamid. — Über den Mechanismus selbst, der bei der Entwicklung der Mucininfektionen wirksam ist, liegen auch eine Reihe Untersuchungen, u. a. von *Ørskov*, vor; doch soll auf dieselben in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen werden.

Es ist natürlich klar, dass eine durch einen solchen Kunstgriff erzeugte Infektion nicht direkt vergleichbar mit den von den genannten Bakterien im menschlichen Organismus verursachten Infektionskrankheiten ist. Aber da mit Hilfe des Mucins doch eine wirkliche Infektion bei dem Versuchstiere mit sehr lebhaftem Bakterienwachstum im Peritoneum, schnell eintretender Bakteriämie und Bakterienaussaat nach allen Organen hervorgebracht wird, wird die Methode in vielen Beziehungen ähnliche Bedingungen für chemotherapeutische Untersuchungen schaffen wie die mehr »natürlichen« Infektionen mit virulenten Bakterien. Und nichtzumwenigsten deswegen, weil man sonst darauf angewiesen war, seine Untersuchungen mit diesen Bakterien nur *in vitro* vorzunehmen, muss man der Methode einen Wert beimessen; denn Versuche *in vitro* geben nur sehr begrenzte Aufschlüsse, falls sie nicht geradezu, wie es mit einigen Stoffen, z. B. *Prontosil rubr.*, der Fall ist, ganz versagen, weil der Stoff erst eine intravitale Umbildung durchgehen muss, ehe er seine Wirkung ausüben kann.

In einer Reihe Untersuchungen über neuere Chemotherapeutika bei verschiedenen experimentellen Infektionen habe ich daher auch die Mucinmethode in recht grossem Ausmasse angewandt, u. a. zu Versuchen mit Meningokokken, *Bact. coli*, *Bact. paradysenteriae* und *Bact. typhi*. Die benutzte Technik ist die von *Miller* angegebene:

Mucin aus Schweinemägen wird in einer Menge von 5% in destilliertem Wasser suspendiert, autoklaviert und mit *n* NaOH bis zu p_{H} 7,3 neutralisiert. Zu 9 Teilen Mucinsuspension wird 1 Teil Bakterienkultur nach eventueller Verdünnung zugesetzt, worauf 1 ccm der Mischung intraperitoneal in weisse Mäuse von 16–20

Gramm Gewicht injiziert wird. Die Mäuse werden recht schnell schlaff und, bei Wahl eines geeigneten Bakterienstammes und einer passenden Kulturverdünnung, sterben sie, in der Regel nach 16—48 Stunden, an Sepsis. — Die chemotherapeutische Behandlung ging hauptsächlich auf peroralem Wege vor sich, indem die Stoffe in gleichen Teilen Mucilago gummi arabici und destilliertem Wasser suspendiert und mit der Sonde in den Magen gebracht wurden. Sulfapyridin wurde stets einmal täglich an 3 aufeinander folgenden Tagen gegeben, und zwar am 1. Tage 60 mg, am 2. und 3. Tage 40 mg. Sulfathiazol wurde wegen der schnelleren Resorption und Ausscheidung zweimal täglich mit 12stündigem Intervall, und zwar insgesamt 5mal, gegeben. Die Einzeldosis war 25 mg, die Gesamtdosis also 125 mg. Sulfamethylthiazol wurde wie Sulfathiazol dosiert, nur konnte man auf Grund der geringeren Toxizität für Mäuse bei peroraler Einverleibung eine etwas grössere Menge geben; die Einzeldosis war 40 mg, die Gesamtdosis also 200 mg. — Bei einzelnen Versuchen geschah die Eingabe auf subkutanem Wege, indem die Stoffe in Suspension in Oleum sesami injiziert wurden; die Dosierung ist bei den betreffenden Versuchen angegeben. — Die erste chemotherapeutische Dosis wurde stets 1—2 Stunden vor der Infektion gegeben. Die überlebenden Mäuse wurden 14 Tage lang beobachtet.

Auf diese Weise habe ich Versuche mit einem *Meningokokken*stamme angestellt, der seit ca. 3 Jahren im Laboratorium fortgezüchtet worden war. Angewandt wurde stets eine ganz junge Kultur, 5—6 Stunden altes Wachstum auf Ascitesagar, welche in physiologischer Kochsalzlösung zu einer Dichte von ca. 10^9 Bakterien pr. ccm aufgeschwemmt wurde. Hiervon wurden Verdünnungen in Mucinsuspension hergestellt. 1 ccm der Verdünnung mit 10^6 Meningokokken wirkt mit fast 100 %iger Sicherheit tödlich auf die Mäuse, die Verdünnung mit 10^4 tötet ca. 50 %. Die Resultate der chemotherapeutischen Behandlung sind aus Schema 1 zu erschen.

Von allen gestorbenen Kontrollmäusen wurden Meningokokken in grosser Menge aus dem Herzblut gezüchtet. Dagegen gab die mit Sulfathiazolinjektionen behandelte, verendete Maus kein Wachstum. Sie ist vermutlich an einer Medikamentintoxikation gestorben, da die angewandte Dosis Sulfathiazol nahe der für Mäuse toxischen Dosis lag.

In der gleichen Weise wurde ein Laboratoriumsstamm von

Schema 1.

Meningokokkendosis	10^7		10^6		10^4	
	Anzahl Mäuse	Ge- storb.	Anzahl Mäuse	Ge- storb.	Anzahl Mäuse	Ge- storb.
Kontrollen	6	6	6	6	3	2
Sulfapyridin per os	6	0	6	0	3	0
Sulfathiazol per os	6	0	6	0		
Sulfamethylthiaz. per os	6	0	6	0		
Sulfathiazol subkutan, 50 + 20 + 20 + 20 + 20 mg mit 12stdg. Intervall	3	1				

Bact. coli untersucht. Bei diesem ist die Mucinwirkung besonders ausgesprochen, da die ca. 500 Bakterien enthaltende Verdünnung 1:1.000.000 einer 16 Stunden alten Bouillonkultur in ca. 36 Stunden tödlich wirkt, während schon eine Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung von 1:10 nur einzelne der Mäuse tötet. Schema 2 zeigt die Ergebnisse der chemotherapeutischen Behandlung:

Schema 2.

B. coli:

Kulturverdünnung in Mucin	10^{-2}		10^{-4}		10^{-6}	
	Anzahl Mäuse	Ge- storb.	Anzahl Mäuse	Ge- storb.	Anzahl Mäuse	Ge- storb.
Kontrollen	3	3	6	6	6	6
Sulfapyridin per os	3	1	6	1	6	0
Sulfathiazol per os			3	0	3	1
Sulfamethylthiazol per os ...			3	0	3	0
Sulfathiazol subkutan, 50 + 25 + 25 mg mit 24stdg. In- tervall	3	1	3	0	3	0

Von sämtlichen eingegangenen Kontrollmäusen wurde *B. coli* in reichlichem Masse aus dem Herzblut gezüchtet, während nur 1 der mit Sulfapyridin und 1 der mit Sulfathiazol behandelten, verendeten Mäuse Coliwachstum ergab.

Bact. paradysenteriae Flexner: Auch diese sonst mäuseapathogene Bakterie zeigte in Mucin eine recht beträchtliche Infektiosität. Eine 18stündige Bouillonkultur des Flexnerstammes wirkte noch in der Verdünnung 1: 100.000 in Mucin tödlich auf den grössten Teil der Mäuse. Auch gegenüber dieser Infektion ergab sich ein chemotherapeutischer Effekt, wie aus Schema 3 hervorgeht:

Schema 3.
B. paradysenteriae Flexner.

Kulturverdünnung in Mucin	10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴	
	Anzahl Mäuse	Ge-storb.	Anzahl Mäuse	Ge-storb.	Anzahl Mäuse	Ge-storb.
Kontrollen			6	6	6	6
Sulfapyridin per os	6	3	6	0	6	0
Sulfathiazol per os	6	0	5	0	6	0
Sulfamethylthiazol per os ...	6	1	6	1	6	1

Die Todesursache der beiden mit den Verdünnungen 10⁻³ und 10⁻⁴ infizierten und mit Sulfamethylthiazol behandelten, eingegangenen Mäuse ist unsicher. Sie zeigten kein Wachstum von Flexnerbakterien aus dem Herzblut, und sie starben später, am 3. bzw. 6. Tage nach der Infektion, als die übrigen eingegangenen Mäuse, die alle vor dem 3. Tage starben, und die alle reichliches Wachstum von *B. Flexner* aus dem Herzblut ergaben.

Schliesslich sind entsprechende Versuche mit einem Stamm von *Bact. typhi* (ohne Vi-antigen) vorgenommen worden. Der Stamm vermochte in einer 18stündigen Bouillonkultur noch in der Verdünnung von 1: 100 in Bouillon auf Mäuse tödlich zu wirken, obschon die gleiche Verdünnung in Mucin einen

schnelleren und sichereren Tod gab. Grössere Verdünnungen, selbst in Mucin, gaben unsichere Resultate. Als Versuchsdosis wurde daher die Verdünnung 1: 100 in Mucin gewählt. Die Wirkung der Chemotherapie ist aus Schema 4 zu erschen:

Schema 4.

Bact. typhi, Bouillonkultur verdünnt 10^{-2} in Mucin.

	Anzahl Mäuse	Gestorb.
Kontrollen	6	6
Sulfapyridin per os	6	0
Sulfathiazol per os	6	1
Sulfamethylthiazol per os	6	1

Die trotz der Sulfamethylthiazolbehandlung verendete Maus starb erst 6 Tage nach der Infektion. Das Herzblut war steril. Die übrigen eingegangenen Mäuse starben binnen 48 Stunden und zeigten Wachstum von *B. typhi* aus dem Herzblut.

Man sieht also eine ausgesprochene Wirkung der chemotherapeutischen Behandlung gegenüber allen untersuchten Mucininfektionen. Das vorliegende kleine Material kann natürlich zu keinen Schlussfolgerungen darüber berechtigen, welcher von den 3 angewandten Stoffen die kräftigste Wirkung hat, und dies umso weniger, als die Resorptions- und Ausscheidungsverhältnisse der Stoffe im Verlaufe der Infektionen nicht untersucht worden sind. Die angewandten Dosierungen wurden empirisch festgelegt und sind vielleicht weit entfernt von den idealen Dosen. Nähere Untersuchungen hierüber sind im Gange. — Die gute Wirkung gegen Meningokokken- und Coliinfektionen stimmt mit zahlreichen Erfahrungen der Klinik überein. Vielleicht werden die Stoffe auch von einem gewissen Wert gegenüber dem bakteriämischen Stadium von Typhus sein können, vielleicht werden sie zu einem kürzeren und leichteren Verlauf der Krankheit beitragen und das Risiko für den Patienten, Bazillenträger zu werden, vermin-

dern können. Wenn auch die nachgewiesene Wirkung gegenüber experimenteller Allgemeininfektion mit pathogenen Darmbakterien natürlich kein Recht dazu gibt, auf eine entsprechende Wirkung gegen lokale Darminfektionen zu schließen, so zeigten diese Bakterien doch hier eine intravitale Empfindlichkeit gegenüber den chemotherapeutischen Stoffen, die zur Weiterarbeit ermutigt.

Zusammenfassung.

Mit Hilfe von Schweinemagenmucin a. m. Miller wurden experimentelle Infektionen mit Bakterien erzeugt, welche sonst apathogen oder sehr wenig pathogen für Mäuse sind. Diese Infektionen wurden mit Chemotherapeutika behandelt, und es wurde eine gute therapeutische Wirkung von Sulfapyridin, Sulfathiazol und Sulfamethylthiazol gegenüber Meningokokken, *B. coli*, *B. paratyphicae* Flexner sowie *B. typhi* beobachtet.

LITERATUR.

- Brown, T. M.*: Bull. Johns Hopkins Hosp. 61, 272, 1937.
Buttle, G. A. H., Gray, W. H. & Stephenson, D.: Lancet I, 1286, 1936.
 — *Parish, H. J., McLeod, M. & Stephenson, D.*: Lancet I, 681, 1937.
Cohn, A. & Peizer, L. R.: J. Infect. Dis. 63, 77, 1938.
Fisk, R. T.: J. Infect. Dis. 68, 20, 1941, ref. in Zbl. ges. Hyg. 48, 444, 1941.
Levaditi, C. & Vaisman, A.: Presse méd. 78, 1371, 1937.
Long, P. H. & Bliss, E.: »The Clinical and Experimental Use of Sulfanilamide, Sulfapyridine and Allied Compounds.« The Macmillan Comp., New York, 1939.
Miller, C. P.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 32, 1136, 1935.
Nungester, W. J., Wolf, A. A. & Jourdonais, L. F.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 30, 120, 1932.
Proom, H.: Lancet I, 16, 1937.
Rist, N. & Thibault, P.: C. R. Soc. Biol. 133, 608, 1940.
Rosenthal, S. M., Bauer, H. & Branham, S. E.: Pub. Health Rep. 52, 662, 1937.
Whitby, L. E. H.: Lancet I, 1517, 1937.
Ørskov, J.: Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 98, 359, 1940.

THE INFLUENCE OF »MUCIN 1701 W« ON INFECTION WITH SHOPE FIBROMA AND VACCINIA VIRUSES.

By Johannes Clemmesen*) and Else Krag Andersen.

(Received for publication May 28th, 1941).

It has been demonstrated with meningococci (Miller & Castles) and *b. typhi* (Rake) that a suspension in mucin causes a considerable decrease of the minimal lethal doses for these bacteria. The nature of this effect of mucin is not clear. Some authors consider it as an enhancement of the virulence of the microorganism (Rake, Henderson), though already Miller & Castles stress that the virulence of the bacteria, *sensu strictiori* is unaltered. Consequently the latter regard the effect of mucin as a local interference with the function of the defensive mechanism of the host, and recently Ørskov voiced the opinion that this takes place through an action on the reticulo-endothelial system.

As generally known, Shope fibroma virus when introduced into rabbits produces fibroma-like swellings which after about two weeks regress and finally disappear entirely, leaving an immunity against subsequent inoculations. Shope fibroma is of an outspoken benign character, though some authors by means of tar injections (Andrewes and coll. Ahlström) or roentgen radiation (Clemmesen) have succeeded in provoking a general fibromatosis following intravenous injection of virus.

*) With support from »Generalkonsul Ernst Carlsen og Hustrus Legat«.

As it had been demonstrated by one of us (l.c.) that Roentgen irradiation of rabbits, carried out before the inoculation of virus, will delay the development of immunity to Shope fibroma virus, presumably due to an action on the reticulo-endothelial system, it lay near at hand to examine the influence of mucin on infection with this virus, employing the technique formerly employed by Ørskov & Krag Andersen for investigations into the mechanism of infections. The special qualities of Shope virus, however, made it desirable to supplement these examinations with parallel experiments carried out with vaccinia virus. The present paper forms a record on these investigations.

Technique.

Shope fibroma of the OA-strain was kindly supplied by Dr. C. G. Ahlström, while we are obliged to Dr. R. E. Shope for providing us with the »inflammatory variant« of the virus, termed the IA-strain. Material for inoculation was obtained by removal of testes from rabbits which had been inoculated five to seven days earlier. The organs were minced, and kept in a refrigerator.

The mucin employed was »Granular mucin« Type 1701 W, from Wilson & Co., Chicago. It was prepared according to the description by Henderson.

a. Fibroma virus injected intradermally on young rabbits, two days old.

The distribution of fibroma virus in the organs of rabbits injected intratesticularly was investigated by Hurst on adult animals. As the reticulo-endothelial system is less developed in young animals there might be a better chance of obtaining positive results by the application of mucin in young rabbits. Furthermore it might be expected that the spread of virus in the organism would proceed more slowly following intradermal inoculations, thus facilitating the demonstration of a possible effect of mucin. Consequently the first part of the following experiment was undertaken to obtain information on the spread of fibroma virus in normal young rabbits, following intradermal inoculation. In the second part

it was examined whether the suspension of virus in mucin would exert any influence on the result of the inoculation.

The rabbits of each single experiment were belonging to the same litter. They were two days old at the inoculation of virus. They were killed in series, the organs were

Table I.

Distribution of Shope fibroma virus in organs of young rabbits, at an early stage of infection, following intradermal inoculation of 2 X 0.1 cc. of a 2 per cent solution at an age of two days.

Days after Inoculation	Blood	Regional Lymph Node	Tumour	Liver	Spleen	Kidney	Brain
2	0	0		0	0	0	0
3	0	10 ⁻¹		10 ⁻¹	0	0	0
5	10 ⁰	10 ⁻⁵		10 ⁻²	0	10 ⁻²	0
7	10 ⁰		10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻¹	0
10	10 ⁻¹		10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻²	10 ⁻⁵	(+)
16 (dead)	10 ⁻¹			10 ⁻⁸	10 ⁻⁵	10 ⁻²	

Table II.

Technique as Table I. Inoculation of Shope fibroma virus suspended in Mucin (+M), compared with watery emulsion of virus (M) 2 X 0.1 cc. of a 5 per cent solution.

Days after Inoculation	Blood		Regional Lymph-node		Liver		Spleen		Kidney		Brain	
	-M	M	-M	M	+M	M	-M	M	+M	M	-M	M
3	0	0	10 ⁻¹	10 ⁻³	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0		10 ⁻²		10 ⁻²		0		0		0	
5*)	0				10 ⁻⁵		10 ⁻¹					
7	0	0	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	0	0
11	0	0			0	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻¹	

*) Signifies an animal from another series.

ground in mortars with a little saline, and the concentration of virus in the organ suspensions was determined by intradermal inoculations of serial tenfold dilutions on the skin of adult rabbits.

It is evident that with this technique we have not succeeded in registering any significant change in the course of infection, ascribable to mucin. It may perhaps be noted that emulsion of the brain from a rabbit inoculated with mucin suspension of virus, provoked a well pronounced fibroma, although the blood from the same animal did not provoke any reaction. As far as our knowledge goes, this virus has not previously been regained from nervous tissue. On the contrary Hurst observed no »takes« from the brains of normally inoculated, adult rabbits.

Apparently inconsistent with this observation and with our experiences from adult rabbits was the fact, that the local response was least pronounced following inoculation with the mucin suspension of virus.

Both groups of animals were equally weak at the end of the experiment.

b. Fibroma Virus and Vaccinia injected intradermally as Mucin Suspension.

The following experiment was undertaken to examine the influence of mucin on the local reactions to intradermal inoculations of fibroma and vaccinia viruses. Each virus was suspended both in mucin and water, and tenfold dilutions of each suspension were injected intradermally on an adult rabbit.

Even from these figures taken from a single day of the experiment, it is evident that, with the exception of one animal, the local reaction to both variants of each virus is favoured by the suspension of virus in mucin, in all cases.

c. Intraperitoneal injection on young rabbits of fibroma virus suspended in mucin.

As already mentioned, the ability of mucin to facilitate bacterial infections has been demonstrated chiefly with intraperitoneal inoculations. Thus Miller & Castles found that the minimal lethal dose for meningococci introduced into the peritoneal cavity, decreased if they were suspended in mucin.

Table III.

The size of skin reactions on the fourth day after injection, given by the average diameter measured in mm. The dose was 0.1 cc, half of which in the case of mucin suspension was mucin.

M = Mucin suspension. W = Watery suspension. C-V = Vaccinia from calves. L-V = Liver vaccinia from rabbits.

Final dilution of virus:	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		10 ⁻⁸		10 ⁻⁹	
	W	M	W	M	W	M	W	M	W	M	W	M	W	M	W	M	W	M
L-V																		
Water.....	16		21		16		11		5		+		0		0		0	
Mucin.....		16		21		20		19		10		6		+		0		0
Water.....	28		0		0		0		0		0		0		0		0	
Mucin.....		27		22		19		13		6		5		3		+		0
C-V																		
Water.....	15		15		12		10		+		+		0		0		0	
Mucin.....		13		11		12		11		8		8		+		+		0
Fibroma virus.																		
OA																		
Water.....	23		16		6		+		+		+		0		0		0	
Mucin.....		19		17		8		+		0		0		0		0		0
Water.....	10		8		0		0		0		0		0		0		0	
Mucin.....		15		14		15		10		9		9		+		+		0
Water.....	17		10		8		+		+		(+)		0		0		0	
Mucin.....		15		14		10		7		+		+		+		+		0
Water.....	6		(+)		0		0		0		0		0		0		0	
Mucin.....		13		7		(+)		(+)		(+)		0		0		0		0
IA																		
Water.....	25		20		15		+		0		0		0		0		0	
Mucin.....		23		20		18		14		+		0		0		0		0
Water.....	9		4		0		0		0		0		0		0		0	
Mucin.....		15		12		4		0		0		0		0		0		0

(This state of affairs was maintained for some hours, and followed by reverse conditions). A similar effect was obtained if the introduction of sterile mucin into the peritoneal cavity was followed by intravenous injection of meningococci. This effect must, however, be explained as a local promotion of the growth of meningococci which happen to settle in the peritoneal cavity. Mucin injected intradermally possessed no such effect.

The following experiments were performed, to examine the influence of mucin on the course of infection following intraperitoneal injection of fibroma virus. The rabbits employed were two days to three weeks old; controls and experimental animals were selected from corresponding litters.

Young rabbits are less resistant to vaccinia virus than older animals of the same species, (Oluf Andersen). In a preliminary experiment we therefore made sure that there was no difference with regard to the virus neutralising power between sera from rabbits of the following ages adult, six, three, two and one week. The sera tested in the dilutions 1:2, 1:4, etc. until 1:256.

In the main experiment the animals were inoculated into the peritoneal cavity, and serially killed, whereafter the organs were examined for their content of virus in the way already described.

The figures of the following table indicates the highest dilution in which every single organ was capable of producing fibromata of a measurable size. Very small nodules have not been taken into account.

Even from this schematic representation it seems evident, that the spread of an infection with fibroma virus starting from the peritoneal cavity, makes quicker progress if the virus is suspended in mucin. It is also evident that the infection takes a quicker course in the youngest animals, in which the reticulo-endothelial system of defense is least developed. Moreover, the postmortal findings were very different in the two groups of animals. In the rabbits inoculated with mucin suspension of virus the peritoneum and diaphragm

Table IV.

Intraperitoneal inoculation on young rabbits of fibroma virus suspended in mucin.

M = Mucin suspension, W = Watery suspension.

Rabbits two days old.

Day after inoculation	Blood		Liver		Spleen		Omentum		Kidney		Peritoneal Fluid	
	W	M	W	M	W	M	W	M	W	M	W	M
3		0		10^{-3}		0				0		
5	10^{-1}	10^0	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-7}				10^{-7}	10^1	10^1

Rabbits one week old.

3				10^{-2}		10^{-1}						
5	0	0	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}		10^{-7}			10^{-2}	10^{-1}
8	0	0	10^{-2}	10^{-2}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-2}	10^{-5}

Rabbits three weeks old.

5	0	0	0	0	0	0						
8	0	0	0	0	10^{-3}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-8}				

were transformed into fibromatous masses, whereas the other group of rabbits showed far less progressed stages of the same development. This difference was most pronounced in the youngest animals and may probably be ascribed to the quicker spread of virus in the latter, which causes an earlier beginning of the proliferative response to the virus. But on account of the temporary character of the growth of Shope fibroma the difference must gradually fade away.

d. Intravenous injection of fibroma virus combined with intradermal injection of mucin.

It has been shown by previous investigators that fibroma virus, if intravenously injected, is incapable of producing universal effects visible to the naked eye. The only exceptions

from this rule are formed by the so-called »generalised pocks« (Andrewes 1936), and by the spread observed in single cases of injection of an excessive dose of virus. (Clemmesen 1939).

The following experiment was attempted in the hope of throwing some light upon the extension of the local influence on resistance, exerted by mucin. It might perhaps be expected that an intradermal deposit of mucin would facilitate a localisation of virus.

Rabbit A. received 1 cc. of a 1 per cent emulsion of virus intravenously. At the same time we applied eight intradermal injections, each of 0.1 cc. of mucin. No effects were observed.

Rabbit B. had an injection of 5 cc. of a 5 per cent watery emulsion of virus into a vein, and simultaneously seven intradermal injections of 0.1 cc. of mucin. One week later 5 cc. of a 20 per cent solution of mucin was injected intravenously, and two days after this an eruption of »generalised pocks« was observed. It disappeared within the usual time uninfluenced by the intravenous application of 10 cc. of mucin suspension.

Thus in spite of the application of heavy doses of virus, we did not observe any tendency of localisation of fibromatous changes to the site of the mucin intradermally deposited.

c. Intravenous injection of fibroma virus suspended in mucin.

Each of four rabbits received in a vein 2.5 cc. of a 10 per cent watery emulsion of fibroma virus suspended in 2.5 cc. of mucin. Eruptions of »generalised pocks« appeared in three of the animals a week later.

Three control rabbits were treated correspondingly with 5 cc. of a 5 per cent watery emulsion of fibroma virus. Two of these animals died immediately.

None of the rabbits of this experiment showed any dissemination of fibroma nodules to the sites typical for the general fibromatosis following tar treatment or roentgen radiation, neither did the postmortal examination three weeks after the beginning of the experiment reveal any sign of internal fibromata.

f. Intravenous injection of mucin combined with intradermal injection of fibroma or vaccinia virus.

We entered upon the following experiment in order to examine the possibility of hampering the resistance of rabbits to virus by means of intravenous injection of mucin.

4 cc. of mucin was injected intravenously on two rabbits, one of which died immediately. On the skin of the surviving rabbit, and on a normal control, fibroma virus was injected in tenfold dilutions, as stated below.

Table V.

Fibroma virus.									
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
5th day									
Control rabbit	18	7	0	0	0	0	0	0	0
Mucin	25	17	13	5	0	0	0	0	0
7th day									
Control rabbit	23	12	6	0	0	0	0	0	0
Mucin	29	17	12	8	0	0	0	0	0
12th day									
Control rabbit	28	18	15	5	0	0	0	0	0
Mucin	37	28	15	8	+	0	0	0	0
Repetition.									
5th day									
Control rabbit	18	13	5	0	0	0	0	0	0
Mucin	21	18	12	5	0	0	0	0	0
7th day									
Control rabbit	20	18	17	*14	5	0	0	0	0
Mucin	22	20	14	12	+	0	0	0	0
12th day									
Control rabbit	25	19	14	8	0	0	0	0	0
Mucin	25	23	15	10	0	0	0	0	0

Corresponding experiment with vaccinia virus (L-V)

Rabbit 1: 0.5 cc. Mucin. Rabbit 2: 1 cc. Mucin. Reactions mapped on 4th day.

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Control rabbit	25n	25n	24n	22	12	(+)	0	0	0
Rabbit 1		14	23	24	15	14	0	0	0
Rabbit 2		23	23	23	24	10	0	0	0

(n = necrotic state of local reaction)

In the first days there is a marked difference between the rabbits treated with mucin and the control animals. This difference disappears gradually during the following days.

Discussion.

The figures given in the different tables are, of course, only of limited value as an expression of the actual reactions found in the animals. Nevertheless, they substantiate that mucin, also in the case of virus infections with Shope fibroma or vaccinia under certain circumstances is capable of exerting a facilitating influence on the course of infection.

The results of the present investigations are easily fitted into the framing of our present knowledge of the effects of mucin on bacterial infections. Thus it seems quite understandable that mucin favours intraperitoneal inoculations of fibroma virus, and the decrease of the virus dose necessary for intradermal »takes«, which follows intravenous injections of mucin, may be regarded merely as a maximal expansion of the »local interference with the defensive powers of the organism«. Also the local effect of mucin on intracutaneous reactions to fibroma and vaccinia viruses, though less pronounced has some features in common with the effects of tar and roentgen radiation on fibroma virus.

Ahlström found that injections of Indian ink or Trypan blue before the inoculation of fibroma virus would delay the reaction to the latter, presumably on account of a local blockage of the reticulo-endothelial system, which is supposed to absorb the virus and subsequently to proliferate. Ledingham took a similar view on the effect of Indian ink on vaccinia. It might perhaps have been tempting to adopt a similar explanation in our case, but for the fact that the effect of mucin on vaccinia — and fibroma virus — is directly contrary to that which Ledingham ascribed to a local reticulo-endothelial blockage.

Summary:

1. Suspension in mucin of fibroma virus exerts no demonstrable influence on the spread of virus following intradermal inoculation on young rabbits.

2. The spread of fibroma virus following intraperitoneal inoculation is favoured by mucin. This applies also to the proliferative response to such inoculations.

3. The local reaction to intradermal injection of fibroma virus and vaccinia is increased by mucin, and the minimal effective dose is reduced.

4. Intravenous injection of mucin reduces the minimal effective dose of fibroma or vaccinia virus, intradermally injected.

LITERATURE.

- Ahlström, C. G. & Andrewes, C. H.*: Journ. Path. & Bact. 47: 65, 1938.
 — Journ. Path. & Bact. 46: 461, 1938.
Andersen, Oluf: Undersøgelser over Vaccinevirus. Copenhagen 1936.
Andrewes, C. H.: Journ. Exp. Med. 63: 157, 1936.
 — & *Shope, R. E.*: Journ. Exp. Med. 63: 179, 1936.
 — & *Ahlström, C. G.*: Journ. Path. & Bact. 47: 87, 1938.
 — — *Foulds, L. & Gye, W. E.*: Lancet 893, 1937.
Bieling, R. & Öhrichs, L.: Zeitschr. f. Immunforsch. 95: 57, 1939.
Buttle, G. A. H., Parish, H. J., MacLeod, M. & Stephenson, M.: Lancet I: 681, 1937.
Clemmensen, J.: Amer. Journ. Cancer 35: 378, 1939; this Journal Suppl. 38: 47, 1938.
Henderson, D. W.: Brit. Journ. Exp. Path. 20: 1, 1939.
Hurst, E. W.: Brit. Journ. Exp. Path. 18: 23, 1937.
Ledingham, J. C. C.: Brit. Journ. Exp. Path. 8: 12, 1927.
Miller, C. P. & Castles: Journ. infect. dis. 58: 263, 1936.
Rake, G.: Journ. Exp. Med. 61: 545, 1935.
 — Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 32: 1523, 1935.
Shope, R. E.: Journ. Exp. Med. 63: 173, 1936.
Orskov, J.: Microbiological Congress New York 1939.
 — & *Krag Andersen, E.*: Zeitschr. f. Immunforsch. 92: 187, 1938.

DIE BEDEUTUNG DER KOHLENSÄURE FÜR DIE ZÜCHTUNG VON MENINGOKOKKEN UND ANDEREN BAKTERIEN AUS SPINALFLÜSSIGKEITEN.

Von N. Harhoff.

(Eingegangen bei der Redaktion am 2. Juni 1941).

Die Züchtung von Meningokokken war immer mit Schwierigkeiten verbunden, weshalb im Laufe der Zeit eine Menge verschiedene Substrate und Züchtungsmethoden vorgeschlagen wurden. Im Jahre 1916 wiesen *Cohen* und *Markle* (3) darauf hin, dass man in bedeutend mehr Fällen Wachstum von Meningokokken erhält, wenn man die Züchtung in einem Glase vornimmt, das durch einen Gummischlauch mit einem anderen Glas verbunden ist, das eine *Subtilis*-Kultur enthält, eine Methode, die ursprünglich von *Nowak* (1908) (10) zur Züchtung von *Brucella abortus* Bang angegeben war. Man meinte damals, dies rühre daher, dass *Bacillus subtilis* die Sauerstoffspannung herabsetze, indem er etwas von dem Sauerstoff in den Gläsern verbrauche. Um die Bedeutung der verminderten Sauerstoffspannung zu zeigen, untersuchten *Cohen* und *Fleming* (1918) (2) das Wachstum in Gemischen von atmosphärischer Luft und Kohlensäure, die sie als ein indifferentes Gas ansahen. Hierbei fanden sie, dass ein Meningokokkenstamm, der unter gewöhnlichen aeroben Verhältnissen nicht wuchs, sehr reichlich in 10 % und 20 % Kohlensäure gedieh, mit zunehmender Konzentration wuchsen sie schlechter, aber noch in 75 % Kohlensäure war etwas Wachs-

tum vorhanden. Die Kohlensäuremischungen stellten sie her, indem sie eine abgewogene Menge Karbonat mit einem Überschuss von Schwefelsäure in einem Zylinderglas versetzten, der gleich darauf verschlossen wurde.

Diese Versuche gaben den Anstoss, die Frage der Bedeutung der Luftzusammensetzung in den folgenden Jahren genauer zu untersuchen. *Gates* (4) und *Kohman* (7) (beide 1919) zeigten, dass die geringe Herabsetzung der Sauerstoffspannung, die bei der Subtilis-Methode eintrat, keine Rolle spielte, *Kohman* zugleich, dass 10 % Kohlensäure nützlich war. Das Gleiche wurde bei *Gonokokken* und *Brucella abortus* von *Chapin* (1918) (1) bzw. *Huddleson* (1921) (5) nachgewiesen. Letzterer zeigte zugleich, dass *Bacillus subtilis* bei seinem Wachstum CO_2 entwickelte. Später haben sich *Rockwell* (12) und seine Mitarbeiter mit dem Problem beschäftigt und unter anderem gezeigt, dass man Meningokokken dahin bringen kann, in einer Stickstoffatmosphäre anaerob zu wachsen, wenn nur Kohlensäure vorhanden ist. Endlich zeigte *Wilson* (13, 14, 15) in einigen Arbeiten mit *Brucella abortus*, dass die nützliche Wirkung verschiedener Züchtungsmethoden auf Kohlensäure beruht. So kann sich Kohlensäure aus gewissen Substraten und aus verschiedenen Stoffen entwickeln, die zum Verschliessen der Kulturgläser gebraucht werden, z. B. aus geschmolzenem Paraffin, Lack, Gummi oder einem flambierten Wattepropfen. Auch ruhende Bakterien vermochten, namentlich bei dichter Aussaat, hinreichend Kohlensäure zu entwickeln, um das Wachstum in Gang zu bringen.

Im Laufe der 20er Jahre scheint die Verwendung von Kohlensäure bei der Züchtung von *Brucella abortus* allgemein zu werden. Für die Züchtung von *Gonokokken* haben besonders Arbeiten von *Mc.Leod* und seinen Mitarbeitern (1934) (8) sowie von *Neumann* (1935) (9) Bedeutung erlangt. Ersterer züchtete in geschlossenen Behältern mit einer 10 % Kohlensäureatmosphäre, letzterer auf Platten, die luftdicht an eine Unterschale gekittet waren, nachdem darein etwas Kohlen-säureschnee gebracht war. Beide finden, dass die Kohlensäure den Ertrag vermehrt, auch im Vergleich mit Verschluss ohne

Kohlensäure. *Neumann* schlägt seine Methode auch zur Züchtung von Meningokokken vor. Sonst liegen nur wenige Arbeiten über die Bedeutung der Kohlensäure für Meningokokken vor. In Amerika ist an einigen Stellen die Züchtung in Kohlensäureatmosphäre angewendet worden. (16, 17). Im Jahre 1940 teilt *Peter* (11) mit, dass er gute Ergebnisse mit einer Methode erzielte, die an die Subtilis-Methode erinnert, nur gebraucht er *Coli* statt *Subtilis*.

Im hiesigen Institut wird Züchtung in Kohlensäureatmosphäre seit längerer Zeit bei *Brucella abortus* und Gonokokken verwendet, wie wir damit auch gute Ergebnisse bei Züchtung von Aktinomycceten hatten (*P. Holm*, persönliche Mitteilung). Als es dann einige Male gelungen war, Meningokokken in einer Kohlensäureatmosphäre zu züchten, auch wo die gewöhnliche Züchtung kein Wachstum ergeben hatte (unter anderem für *Borg Petersen*, wie *Jensenius* (6) mitteilt), ging man dazu über, dies als Normalmethode anzuwenden.

Hierbei schlagen wir im Institut gewöhnlich folgendes Verfahren ein: Auf den Boden eines Zylinderglases (Inhalt 5 Liter) mit abgeschliffenem Rand schüttet man etwas Natriumbikarbonat und bringt ein kleines Reagenzglas mit etwa 8 ccm 1-molarer Schwefelsäure so an, dass diese über das Bikarbonat herausfließt, wenn man den Kolben neigt. Nun werden die Substrate hineingebracht und der Zylinder mit einem Metalldeckel, der von einem Metallbügel festgehalten wird, verschlossen. Als Dichtungsmittel kann man einen Gummiring oder Vaseline verwenden. Wenn man nun die Schwefelsäure mit dem Bikarbonat, das im Überschuss vorhanden sein muss, reagieren lässt, entwickelt sich soviel Kohlensäure, dass der Kolben ca. 7—8 % enthalten wird. Um sicher zu sein, dass die Kohlensäure an die Substrate gelangt, muss man in der äusseren Schale einen sterilen Holzspan, ein flambiertes Objektglas oder dergleichen anbringen, sodass der Rand der inneren Schale darauf ruht.*)

*) Hierauf wurde man erst nach Abschluss dieser Arbeit aufmerksam.

Die folgende Arbeit ist eine Untersuchung des Wertes dieser Methode für die täglichen Routineuntersuchungen von Spinalflüssigkeiten. Die Untersuchung umfasst zwischen 400 und 450 Spinalflüssigkeiten, die im Zeitraum 1. 3. 1939 bis 1. 6. 1940 eingesandt wurden. Die Proben stammen vom ganzen Lande, und deshalb ist von der Lumbalpunktur bis zum Beginn der Untersuchung eine recht verschiedene Zeit verstrichen, nämlich von wenigen Stunden bis zu einem Tage, selten mehr.

Die Untersuchung wurde in den meisten Fällen gleich nach dem Eingang begonnen; wo dies nicht möglich war, wurde die Probe bei 37° in den Thermostaten gestellt, wo sie jedoch in der Regel nur wenige Stunden verblieb. Die Spinalflüssigkeiten wurden meistens zentrifugiert, ausser in den wenigen Fällen, wo sie stark purulent waren. Dann wurde ein Ausstrichpräparat gemacht, nach *Gram* gefärbt, und Aussaat auf 2 Blutplatten, 2 Ascitesplatten und in 2 Gläser mit halbflüssigem Agar vorgenommen. Die Aussaat geschah mit der Platinöse, und um stets die gleiche Aussaat zu erhalten, wurde für jedes Paar Substrate dieselbe Platinöse benutzt. Die verwendeten Platten wurden gleichzeitig aus dem Eisschranke genommen und sind deshalb meist von denselben Portionen Substrat hergestellt worden, ohne dass man sich dessen jedoch besonders versichert hat. Die eine Blutplatte, die eine Ascitesplatte und das eine Glas mit halbflüssigem Agar wurden in den Kohlensäurebehälter gestellt, während der andere Satz gleich in den Thermostaten gesetzt wurde. Eine kleinere Anzahl Proben wurde auch in halbflüssigen Agar mit »Hämoglobin« ausgesät.

Die Blutplatten sind sogenannte »dünne Blutagarplatten«, eine Modifikation der gewöhnlichen Blutplatten, die im hiesigen Institut viel gebraucht werden, weil sie zum Nachweis hämolytischer Streptokokken geeignet sind. Sie bestehen aus zwei Schichten, die untere ist gewöhnliche Bouillonpeptonagar, die obere dasselbe Substrat mit einem Zusatz von 5 % Pferdeblut. Beide Schichten sind etwa 2 mm dick. Die Ascitesplatten werden aus 1 Teil Ascites-Flüssigkeit und 2 Teilen Bouillonpeptonagar bereitet. Halbflüssiger Agar besteht aus filtriertem Bouillon mit 0,16 % Agar. Halbflüssiger Agar

mit »Hämoglobin« besteht aus dem gleichen Substrat mit Zusatz von $1\frac{1}{4}$ % pepsinverdaulichem Pferdeblut.

Es gelang, von den untersuchten Spinalflüssigkeiten Meningokokken 35mal von insgesamt 33 Patienten zu züchten; hierzu kommt ein Fall, wo man bei direkter mikroskopischer Untersuchung gramnegative intracelluläre Diplokokken fand, aber auf keinem der verwendeten Substrate Wachstum erhalten konnte. Die Diagnose Meningokokken wurde gestellt, wenn auf Ascitesplatte*) typisches Wachstum von gramnegativen Diplokokken eintrat, die bei Wachstum auf Ascitesagar mit Maltose und Glukose, jedoch nicht mit Lävulose, Säure bilden. Zwei Stämme (beide von demselben Patienten) entwickelten allerdings mit Maltose keine Säure; nach der Vergärung kann es sich recht wohl um Gonokokken gehandelt haben, da sie aber wuchsmässig am meisten Meningokokken ähnelten, drehete es sich höchst wahrscheinlich um Meningokokken. Derselbe Bazillus wurde in den folgenden 5 Wochen 6mal aus dem Rhinopharynx des Patienten isoliert.

In Tabelle 1 ist angeführt, wie in jedem einzelnen Falle das Wachstum auf den verschiedenen Substraten war. Das Resultat ist zusammengefasst in Tabelle 2. Hier ist angeführt, wie oft die Probe vorgenommen wurde, und wie oft sie positiv war.

Man ersieht hieraus, dass Blutplatte ohne Kohlensäure bei weitem das schlechteste Substrat ist; oft zeigt sich überhaupt kein Wachstum und wo solches da ist, finden sich nur wenige, kleine und verstreute Kolonien. Die Ascitesplatte ohne Kohlensäure ist viel besser, sie versagt seltener, und die Kolonien sind grösser, und nicht gar zu selten finden sich ebenso viele Kolonien wie auf den Kohlensäureplatten. Halbflüssiger Agar ist das Substrat, das ohne Kohlensäure das beste Wachstum gibt, hat aber auch in Fällen, wo auf den Kohlensäureplatten reichliches Wachstum war, versagt. Dafür findet sich hier keine deutliche Wirkung von Kohlensäure. Dies ist dagegen in hohem Grade bei der Blutplatte der Fall; die Ko-

*) 2 Stämme wurden jedoch nicht auf Ascitesplatte untersucht.

Tabelle 1.

Nr.	Dir. Mikr.	Blutagarplatte		Ascitesagarpl.		Halbflüs. Agar	
		÷ CO ₂	+ CO ₂	÷ CO ₂	+ CO ₂	÷ CO ₂	+ CO ₂
451/38-39	+			0 ¹	+ ¹	+ ¹	
468/38-39	0	0 ³	1 ¹	3 ¹	2 ¹	0 ¹	
18/39-40	v	0 ²	v ¹	0 ¹	v ¹	+ ¹	+ ¹
21/39-40 n. T.	0	0 ²	0 ¹ v ¹	0 ²	4 ¹ v ¹		+ ¹
22/39-40 n. T.	v	0 ²	v ¹ + ¹	38 ¹	v ¹ + ¹		+ ¹
27/39-40 n. T.	0	0 ²	0 ² 0 ¹	2 ¹	0 ² 0 ¹	0 ²	0 ²
36/39-40	0	0 ¹	1 ²	1 ¹	2 ¹	+ ²	+ ²
37/39-40	+	0 ²	v ¹	v ¹	v ¹	+ ¹	+ ¹
87/39-40	v	0 ²	v ¹	0 ²	v ¹	0 ¹	+ ¹
115/39-40	+	0 ¹	v ¹	13 ¹	v ¹	+ ¹	+ ¹
129/39-40 n. T.	0	0 ²	1 ¹ 0 ¹	0 ²	0 ² 0 ¹	0 ²	0 ² 0 ¹
147/39-40 n. T.	+	0 ³ 0 ²	+ ¹ 0 ²	1 ² 0 ²	0 ²	+ ¹	+ ¹
179/39-40	+	20 ¹	v ¹	v ¹	v ¹	+ ¹	+ ¹
192/39-40	v	50 ¹ v ²	v ¹	v ¹	v ¹	+ ¹	+ ¹
217/39-40	0	0 ³	8 ¹	0 ³	10-15 ¹	0 ³	+ ¹
219/39-40	0	0 ²	0 ²	0 ²	1 ¹	+ ²	+ ²
241/39-40	v	50 ¹	v ¹	v ¹	v ¹	+ ¹	0 ³
288/39-40 n. T.	0	0 ³	1 ¹ v ¹	0 ³	1 ² v ¹	+ ²	+ ² + ¹

(Fortsetzung).

Tabelle 1. (Fortsetzung).

Nr.	Dir. Mikr.	Blutagarplatte.		Ascitesagarpl.		Halbfliß. Agar.	
		÷ CO ₂	+ CO ₂	÷ CO ₂	+ CO ₂	÷ CO ₂	+ CO ₂
291/39-40 n. T.	0	0 ³	0 ¹	0 ³	+ ¹ 0 ²	0 ³	0 ³ 0 ²
303/39-40	v	v ¹	v ¹	v ¹	v ¹	+ ¹	+ ¹
331/39-40 n. T.	1	0 ²	0 ² 0 ²	2 ²	1 ² 0 ²	0 ²	0 ² 0 ²
334/39-40	w	0 ¹	+ ¹	0 ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
345/39-40	0	0 ¹	0 ²	+ ²	+ ²	0 ²	0 ²
374/39-40	0	0 ³	0 ³	0 ³	0 ³	+ ^{2,3}	0 ³
11/40-41	v	v ²	v ¹	v ¹	v ¹	+ ¹	+ ¹
14/40-41 n. T.	+	0 ²	0 ²	0 ²	0 ²		+ ^{2,3}
16/40-41	+	w ²	v ¹	0 ¹	v ¹	0 ¹	+ ¹
24/40-41 n. T.	0 v	2 ²	2 ³	0 ²	2 ³ v ¹	+ ³	
38/40-41	v	0 ²	v ¹	8 ²	v ¹	+ ¹	+ ²
39/40-41	v	0 ²	+ ¹	0 ²	+ ¹	+ ¹	+ ¹
47/40-41	w	0 ¹	18 ¹	10 ¹	13 ¹	+ ¹	
51/40-41	0	2 ¹⁻² 6 ³	v ¹⁻²	2 ¹⁻²	v ¹⁻²	+ ¹	+ ¹
55/40-41 n. T.	0	0 ³	0 ³	0 ³	3 ¹ v ¹⁻²		
69/40-41	v	0 ²	v ¹	0 ²	v ¹	+ ¹	
70/40-41	v	0 ¹	v ¹	0 ¹	v ¹	+ ¹	

Untersuchung von 35 Spinalflüssigkeiten woraus Meningokokken isoliert wurden.

In 1. Kolonne ist die Nummer der Probe angeführt, in 2. Kolonne, wie viele Meningokokken bei direkter Mikroskopie gefunden sind. Die letzten Kolonnen geben das Wachstum auf den verschiedenen Substraten an (\div CO₂ = in gewöhnlicher, atmosphärischer Luft, + CO₂ in 7–8 % Kohlensäureatmosphäre)

v¹ = viele Kolonien, am 1. Tag gewachsen.

w² = wenige Kolonien zuerst am 2. Tag gewachsen.

3^{1–2} = am 1. oder 2. Tag Wachstum von 3 Kolonien.

+ = Wachstum ohne Angabe der Zahl der Kolonien.

0² = kein Wachstum, Substrat 2 Tage beobachtet.

50¹ v² = 50 Kolonien am 1. Tag, viele am 2.

n. T. = Aussaat am nächsten Tag.

Tabelle 2.

	Dir. Mikr.	Blutagarpl.		Ascitesagarpl.		Halbflüs. Ag.	
		\div CO ₂	+ CO ₂	\div CO ₂	+ CO ₂	\div CO ₂	+ CO ₂
Zahl der Untersuchungen	35	33	33	34	33	30	26
Hiervon positive:	Anzahl	21	8	25	17	30	21
	%	60	24	76	50	91	73

Vergleichung zwischen den verschiedenen Substraten.

lonien in Kohlensäure werden gross und wohlentwickelt, und dieses Substrat hat in keinem der Fälle versagt, wo auf den Ascitesplatten reichliches Wachstum war. Ascitesplatte in Kohlensäure ist indessen das beste Substrat; die Kolonien sind hier noch grösser als auf der Blutplatte in Kohlensäure, und in den wenigen Fällen, wo kein Wachstum zustande kam, waren höchstens 2 Kolonien auf den anderen Platten, ja in einem Falle zeigte sich Wachstum nur in einem Glase mit halbflüssigem Agar am 3. Tage. Der Grund war wahrscheinlich der, dass sich in der Spinalflüssigkeit sehr wenige lebende Meningokokken und keiner in dem Tropfen befanden, der auf diesem Substrate ausgebreitet wurde.

Da man dachte, es wäre möglich statt halbflüssiges Agars halbflüssigen Agar mit »Hämoglobin«, das für *Pfeiffer's* Ba-

zillus das beste Substrat ist, zu verwenden, so untersuchte man in einigen wenigen Fällen das Wachstum auf diesem Substrate. Es scheint aber schlechter zu sein; es hat nur in 3 von 9 Fällen Wachstum gegeben, und hat auch in Fällen versagt, wo auf den anderen Substraten reichliches Wachstum vorhanden war. Spätere Erfahrungen bestätigt diesen Eindruck.

Von den 35 Spinalflüssigkeiten waren 25 von Kopenhagen, 2 von Seeland, 1 von Fünen und 7 von Jütland, hierunter zwei von so fernen Städten wie Aalborg und Løgster. Diese Aufzählung zeigt, dass Meningokokken mindestens in einigen Fällen vor der Untersuchung einen längeren Versand vertragen kann.

Für die praktische Anwendung der Methode spielt es eine grosse Rolle, wie die Kohlensäure auf andere Bakterien wirkt. Diese scheinen nun glücklicherweise entweder günstig beeinflusst zu werden oder ganz indifferent zu sein. Die wichtigsten sind Pneumokokken und *Pfeiffer's* Bazillus. Pneumokokken wachsen auf allen genannten Substraten gut, am besten wohl auf Ascitesagar, aber dafür geben sie auf Blutplatte charakteristische Kolonien. Pneumokokken wurden in 36 Spinalflüssigkeiten von 34 Patienten nachgewiesen, hiervon durch direkte Mikroskopie 26mal, d. h. in 72 % der Fälle. Dies ist jedoch eine Minimalzahl, da einige Spinalflüssigkeiten, wo bei direkter Mikroskopie des Grampräparates oder Untersuchung mit *Neufeld's* Reaktion Pneumokokken gefunden wurden, nur in der Pneumokokkenabteilung untersucht wurden und deshalb nicht in dieses Material mit eingehen. Von diesen 36 Spinalflüssigkeiten wurden 15 sowohl mit wie ohne Kohlensäure untersucht. Hierbei wuchsen Pneumokokken 10mal auf allen Substraten, 1mal versagte Blutplatte ohne Kohlensäure und halbflüssiger Agar mit Kohlensäure, 1mal kam nur Wachstum auf Ascitesplatte in Kohlensäure und 1mal nur auf diesem Substrat und in halbflüssigem Agar. In den beiden letzten Fällen erhielt man kein Wachstum auf irgend einem der Substrate; Pneumokokken wurden aber gefunden, das eine Mal auf einer gewöhnlichen »dicken« Blut-

platte (in der Pneumokokkenabteilung), das andere Mal wuchsen die Pneumokokken bei erneuter Aussaat, nachdem die Probe bei 37° die Nacht über gestanden hatte. In einigen Fällen waren die Kolonien auf den Kohlensäureplatten am grössten, in anderen war kein Unterschied zu bemerken.

Von den hier benutzten Substraten wächst *Pfeiffer's* Bazillus auf Blutplatte und besonders auf halbflüssigem Agar mit »Hämoglobin«.

Auf Ascitesplatte und in gewöhnlichem halbflüssigem Agar wachsen sie aber auch, wenn in der Spinalflüssigkeit rote Blutkörperchen sind. Um das Wachstum zu befördern, kann man auf der Primärplatte sofort einen »Symbioseversuch« anstellen, indem man einzelne Kolonien eines »Ammenbakteriums«, z. B. von Streptokokken oder Staphylokokken auf der Platte aussät. Da nicht alle Stämme hierzu geeignet sind, ist es am besten, einen bekannten Stamm zu halten. Die Diagnose wird sich in vielen Fällen mit recht grosser Wahrscheinlichkeit allein durch direkte Mikroskopie stellen lassen. In dem hier untersuchten Materiale wurde *Pfeiffer's* Bazillus 34 mal bei 32 Patienten gezüchtet; hiervon wurde er 30mal oder in 88 % der Fälle schon bei direkter Mikroskopie gefunden. In 27 Fällen wurde das Wachstum sowohl mit wie ohne Kohlensäure untersucht. Hierbei fand man in der Regel, dass die Kolonien auf den Kohlensäureplatten grösser als auf den anderen waren, und zwar nicht nur mit, sondern auch ohne »Symbiosewirkung«. In einigen Fällen war sogar Wachstum ohne »Symbiose« auf der Ascitesplatte mit Kohlensäure, wo die entsprechende Platte ohne Kohlensäure steril war.

Von anderen Bakterien wurden 5mal hämolytische Streptokokken, 2mal nicht-hämolytische Streptokokken und 9mal verschiedene gramnegative Stäbchen gezüchtet (hierunter keines, das der Salmonella- oder Dysenteriegruppe angehörte). Wo sie auf beide Arten untersucht wurden, waren sie gleich gut gewachsen, die hämolytischen Streptokokken jedoch am besten in Kohlensäure.

Wo in der Spinalflüssigkeit nur wenige lebende Bakterien

sind, sodass gleich bei der Aussaat nur wenige oder keine Kolonien kommen, kann man zuweilen reichliches Wachstum erhalten, wenn man die Spinalflüssigkeit die Nacht über bei 37° stehen lässt und am nächsten Tage eine neue Aussaat vornimmt. Aus Tabelle 1 ersieht man, dass diese Untersuchung 10mal auf Spinalflüssigkeiten mit Meningokokken vorgenommen wurde. Hierbei fand man 5mal reichliches Wachstum bei neuer Aussaat am nächsten Tage, 1mal war auch reichliches Wachstum bei der 1. Aussaat gewesen, 4mal dagegen nur wenige, höchstens 4 Kolonien, bei erster Aussaat. Die anderen 5 Male war hingegen kein Wachstum bei Aussaat am nächsten Tage. Pneumokokken und *Pfeiffer*-Bazillen konnte man so dahin bringen, in all den 4 Fällen zu wachsen, wo es untersucht wurde, jeden 1 Mal, wo sie nur auf diese Weise nachgewiesen wurden, und 1 Mal, wo auch am ersten Tage einzelne Kolonien vorhanden waren.

Aus diesen Untersuchungen geht deutlich hervor, dass die Züchtung im Zylinder mit Kohlensäure besseres Wachstum aus Spinalflüssigkeit als die gewöhnliche aerobe Züchtung ergibt. Die Ursache davon mag teilweise die Erhöhung der Kohlensäurespannung im Zylinder sein; man kann sich aber auch vorstellen, dass die vermehrte Feuchtigkeit eine Rolle spielt. Um dies zu erkunden, wurden einige Versuche angestellt.

2 Spinalflüssigkeiten (Nr. 38 und 39/40) wurden auf Blut- und Ascitesplatten ausgesät. Dann wurde ein Satz direkt in den Thermostaten, ein Satz in einen trockenen Zylinder, ein Satz in einen Zylinder mit etwas Wasser auf dem Boden und der letzte Satz in einem Zylinder mit Kohlensäure gestellt. Von den Platten, die direkt in den Thermostaten gebracht wurden, waren die beiden Blutplatten, und die eine Ascitesplatte steril, auf der anderen Ascitesplatte wuchsen nur ganz wenige Kolonien. Dagegen war auf allen Platten, die in den Zylinder gestellt waren, dichtes Wachstum, ohne dass irgend ein Unterschied auf ihnen zu sehen war. — Später wurden 3 Spinalflüssigkeiten (2 mit Meningokokken und 1 mit Pneumokokken) untersucht. Bei diesen Versuchen wurde ein Satz Platten direkt in den Thermostaten gebracht, ein Satz in einen

Zylinder mit Kohlensäure und einer in einen Zylinder mit etwa 20 % KOH auf dem Boden, um zu versuchen, die Kohlensäure der Luft zu entfernen (in wie hohem Masse dies gelang, wurde jedoch nicht untersucht). Hierbei fand sich in allen drei Fällen reichliches dichtes Wachstum im Zylinder mit Kohlensäure. Auf den Platten, die direkt in den Thermostaten gestellt worden waren, waren die Pneumokokken ausgezeichnet, die Meningokokken dagegen gar nicht gewachsen. Im Zylinder mit KOH war in allen drei Fällen gutes dichtes Wachstum auf der Ascitesplatte, keines aber auf der Blutplatte.

Etwas sicheres sagen diese Versuche nicht aus. Bei dem ersten Versuche war das Wachstum im Kolben eben so gut ohne wie mit Kohlensäure; aber nach *Wilson's* früher erwähnter Arbeit ist es nicht ausgeschlossen, dass in dem Zylinder eine etwas höhere Kohlensäurespannung auf andere Weise entstanden ist. Der letzte Versuch könnte darauf hindeuten, dass die Kohlensäure eine Wirkung hat. In Praxis wird man jedoch bis auf weiteres die Anwendung der Kohlensäure empfehlen, teils ist die Mühe nur gering, teils spielt sie vermutlich für einzelne Stämme eine Rolle. So erwähnt *Kohman*, dass er Kohlensäurewirkung auch findet, wo die Feuchtigkeit dieselbe ist, und *Mc. Leod*, *Neumann* wie im hiesigen Institut *Reymann* (persönliche Mitteilung) erhalten häufiger Wachstum von Gonokokken, die ja mit Meningokokken eng verwandt sind, wenn Kohlensäure zur Stelle ist.

Nach den hier gemachten Erfahrungen wird man zur Züchtung von Spinalflüssigkeit empfehlen, eine Blutplatte, eine Ascitesplatte und ein Glas halbflüssigen Agar zu beimpfen; wo Verdacht auf *Pfeiffer's* Bazillus besteht, muss man einen »Symbioseversuch«, z. B. auf Blutplatte anstellen und ein Glas mit halbflüssigem Agar mit »Hämoglobin« besäen. Alle Substrate sind in einen Zylinder mit Kohlensäure zu stellen. Ausserdem soll man den Rest der Spinalflüssigkeit, in den Thermostaten stellen, falls sie zentrifugiert war, nachdem man von der Flüssigkeit ein wenig auf den Niederschlag zurückgegossen hat. Findet sich am nächsten Tage kein Wuchs

auf den Platten, so kann man probieren, ob nicht erneute Aussaat Wachstum ergibt. Die Substrate sind in allen Fällen 2 Tage lang unter Beobachtung zu halten.

Zusammenfassung.

Da Kohlensäure nach der Literatur und früheren eigenen Erfahrungen das Wachstum von Meningokokken bei Züchtung aus Spinalflüssigkeiten zu fördern schien, wurde eine vergleichende Untersuchung über das Wachstum in gewöhnlicher atmosphärischer Luft und in Luft mit 7—8 % Gehalt an Kohlensäure vorgenommen. Insgesamt wurden 400—450 Spinalflüssigkeiten untersucht. Hierbei wurde Wachstum von Meningokokken in 35 Fällen festgestellt, wozu 1 Fall kommt, wo gramnegative intracelluläre Diplokokken durch direkte Mikroskopie gefunden wurden, die aber bei keiner der angewandten Methoden wuchsen. Bei den 35 Fällen zeigte sich die Züchtung in einer Kohlensäureatmosphäre der gewöhnlichen aeroben Züchtung weit überlegen (siehe Tabelle 1 und 2). Im übrigen wurden Pneumokokken und *Pfeiffer's* Bazillus ausser verschiedenen anderen Bazillen isoliert. Sie wuchsen in einer Kohlensäureatmosphäre mindestens eben so gut wie in gewöhnlicher Luft, in einigen Fällen sogar deutlich besser.

In einigen Fällen kann man besseres Wachstum bei erneuter Aussaat von der Spinalflüssigkeit bekommen, nachdem sie bis zum nächsten Tage im Thermostaten gestanden hat.

LITERATUR.

- 1) Chapin, C. W.: J. Infect. Dis. 23, 342, 1918.
- 2) Cohen, M. B. & Fleming, J. S.: J. Infect. Dis. 23, 337, 1918.
- 3) — & Markle, Louis: J. A. M. A. 67, 1302, 1916.
- 4) Gates, Fr. L.: J. Exp. Med. 39, 321, 1919.
- 5) Huddleson, E. F.: The Cornell Veterinarian, 11, 210, 1921.

- 6) *Jensenius, H.*: Nord. med. Tidsskr. 16, 1407, 1938.
- 7) *Kohman, E. F.*: J. Bact. 4, 571, 1919.
- 8) *Mc.Leod, J. W., Coates, J. C., Happold, F. C., Priestley, D. P., & Wheatley, B.*: J. Path. & Bact. 39, 221, 1934.
- 9) *Neumann, H.*: Klin. Wschrift. 15, 58, 1936.
- 10) *Nowak, J.*: Ann. Inst. Pasteur. 22, 541, 1908.
- 11) *Peter, H.*: Klin. Wschrift. 19, 70, 1940.
- 12) *Rockwell, G. E.*: J. Infect. Dis. 32, 98, 1923.
- 13) *Wilson, G. S.*: Br. J. Exp. Path. 11, 157, 1930.
- 14) — Br. J. Exp. Path. 12, 88, 1931.
- 15) — Br. J. Exp. Path. 12, 152, 1931.
- 16) Am. J. Pub. Health, 26 Yearbook, 170, 1936.
- 17) Bull. of Lederle Laboratories. 6, 132, 1938.

DER EINFLUSS DER VERSUCHSTEMPERATUR AUF DIE ISOHÄMAGGLUTINATION IM OCHSENBLUT.

Von Tierarzt O. Hardt,
Kongens Lyngby.

(Eingegangen bei der Redaktion am 22. August 1941).

Eine Reihe von Forschern: — *Todd und White, Clarenburg* (cit. *Hirszfeld*), *R. Ottenberg* und *S. Friedmann* (cit. *O. Thomsen*), *M. Fischbein* (cit. l. c.), *L. Hektoen* (cit. l. c.), *E. Witebsky* und *K. Okabe*, *L. Panisset* und *J. Verge*, *C. Kronacher*, *F. Hogreve* und *R. Hundsörffer*, *H. Brockmann*, *S. Schermer*, *S. G. Winter*, *O. Höfferber* und *S. G. Winter*, *G. Fetth*, *O. Weszeczky*, *G. Lodemann* und *H. M. Jettmar* haben Untersuchungen über den Gehalt des Rinderblutes an Isoantistoff — antigen angestellt und sie meinen, das Vieh in verschiedener Typen in Gleich mit dem Menschen aufstellen zu können. Andere Forscher: *L. Hirszfeld* und *W. Halber, Little* (cit. *Kronacher*), *Rang* (cit. *Lodemann*), *Karshner* (cit. *O. Thomsen*), *W. Kayser*, *Berndt*, *Bonier*, *Jörpes* und *Sköld* findet entweder keinen Isoantistoff oder dieser war in so kleiner Menge anwesend, dass er nur selten eine schwache Agglutination nachweisen konnte.

Bei den Untersuchungen welche ich, teils in Gilleleje und teils in Sorö (über das rote dänische Milchvieh) angestellt habe, stellte es sich heraus, dass die Anzahl von positiven Reaktionen verschieden an denn beiden Orten war, dieser Unterschied zeigte sich besonders, wenn die Untersuchungen mit

Blut von Individuen in einem einzelnen grösseren Viehbestand unternommen wurden (Gilleleje); während das übrige Material von zufälliger wählten Schlachttieren herrührte. So einen Unterschied findet *S. Schermer* auch, indem er derauf aufmerksam macht, dass eine mehr oder minder weit getriebene Inzucht eine grosse Rolle spielt.

Die Versuchsergebnisse zeigten, dass das Rinderblut Isoantistoff enthalten kann, dass aber diese sehr ungleichmässig vorkommt.

Ich fand so:

- 1) Individuen, deren Blutkörperchen von gewissen Sera mit variierendem Titer sich agglutinieren lassen; während Serum von denselben Individuen, die Blutkörperchen (»A«) von diesen Individuen, von wo die erwähnten Sera herrührten, nicht agglutinierte.
- 2) Blutkörperchen, die sich von den erwähnten Sera nicht agglutinieren lassen. Sera von denselben Individuen hatten zuweilen Antistoff für Blutkörperchen (»A«) mit variierendem Titer.
- 3) Schliesslich gab es eine Reihe von Individuen die sich in das oben erwähnte Schema nicht einfügen liess.

In der Versuchstechnik der erwähnten Autoren herrscht einige Unsicherheit mit Rücksicht auf die beste Versuchstemperatur, worunter die Agglutination entstehen kann.

So rechnet *S. Schermer* nur mit Isoreaktionen bei Körpertemperatur, aber er gibt doch an, dass die höhere Temperatur auf die Reaktionstärke ungünstig einwirkt. Er liess das Resultat nach der Verlauf von 4—6 Stunden bei Zimmertemperatur ab.

G. Kronacher, F. Hogleve, R. Hundsörffer, E. Berndt und Karshner (cit. *Hofferber*) benutzen bei den Versuchen eine Temperatur von 20—25° C. *Hirschfeld* benutzt 37.5° C. *G. Lodemann* 18—20° C. *Hofferber* und *S. G. Winter, H. M. Jettmar* bringen die Gläser bei 25° C. an, nach Umschütteln werden die Gläser an eine kühle Stelle (Temp.?) die Nacht hindurch hingestellt, worauf die Ablesung stattfindet (Temp.?).

Die Absicht meiner Untersuchungen ist, den Einfluss der Temperatur auf die Agglutination zu untersuchen.

Technik.

Bei den Versuchen ist Blut von 50 Individuen (zufälliger wählte Schlachttiere) verwendet, indem von jedem Tier zwei Proben entnommen sind, von wo die eine zu Serumausscheidung bei 37° C. hingestellt ist, die ander Probe bei 20° C. Nach 24 Stunden ist kreuzweise Agglutinationsversuche unternommen (0.5 ccm. Serum + 0.1 ccm. Blutkörperchensuspension (za. 1 %) unter Austitrierung der Reaktionstärke. Serum ist nicht inaktiviert, indem Versuche gezeigt haben, dass Inaktivierung die Agglutinationsfähigkeit oder den Agglutinititer nicht verändern konnte, ferner kommt Isohämolyse nie vor.

Die Blutkörperchen sind nicht gewaschen, indem ich keinen Unterschied auf die Reaktion von 1—2—3 mal gewaschen oder nicht gewaschen Blutkörperchen nachweisen konnte.

Nach Mischung von Serum und Blutkörperchensuspension werden die Gläser in Kühlraum bei 0° C. in 24 Stunden hingestellt, wonach die erste Ablesung stattfand, in einem Zwischenraumen von je eine Stunde, wurde die Temperatur 5° erhöht bis 20° C. und jedesmal wurde die Ablesung unternommen. (In der Regel tritt die Agglutination recht snell, von 5—10 Minuten bis eine Stunde ein, nur in einzelnen Zufällen ist über eine Stunde verlaufen bis Agglutination mit maximalem Titer eintrat, ich habe deshalb den Zwischenraum von eine Stunde benutzt, indem die Agglutination ebenso schnell bei den steigenden Temperaturen aufhörte).

In einer einzelnen Versuchsreihe wurde die Temperaturerhöhung bis 37° C. fortgesetzt, aber nur in einer einzelnen Probe kam eine Reaktion bei dieser Temperatur vor, in allen anderen Proben, mit grösserer Amplitude, hörte die Reaktion bei 20—25° C. auf.

Die in denn Text benutzte Sera, die bei 37° C. bzw. 20° C. ausgeschieden sind, werden S.^{37°} bzw. S.^{20°} bezeichnet.

Der Inhalt des Serums von freien Agglutininen, wenn die Serumausscheidung bei verschiedener Temperatur vorgeht.

Lasst man die Serumsscheidung bei 37° C. vor sich gehen, stellt es sich heraus, dass der Inhalt von freien Agglutininen ist grössere als bei Serum bei 20° C. ausgeschieden ist. Gewisse Agglutininfraktionen, der Agglutination bei niedriger

Tafel Nr. 1.

		Serum ₆₃					
		Koaguliert bei 37° C.			Koaguliert bei 20° C.		
		Titer:			Titer:		
		1	2	4	1	2	4
Blutkörperch. ₆₁	0°	+++	+++	÷	÷	÷	÷
	5°	+++	++	÷	÷	÷	÷
	10°	+	÷	÷	÷	÷	÷
	15°	÷	÷	÷	÷	÷	÷
Blutkörperch. ₆₂	0°	+++	+++	÷	÷	÷	÷
	5°	+++	÷	÷	÷	÷	÷
	10°	÷	÷	÷	÷	÷	÷

Agglutinationsversuche mit quantitativer Ausmessung den Reaktionen bei verschiedenen Temperaturen.

Tafel Nr. 2.

		Serum ₆₄					
		Koaguliert bei 37° C.			Koaguliert bei 20° C.		
		Titer:			Titer:		
		1	2	4	1	2	4
Blutkörperch. ₆₃	0°	+++	+++	÷	+++	÷	÷
	5°	+++	+++	÷	+++	÷	÷
	10°	+++	+++	÷	+++	÷	÷
	15°	+++	+++	÷	+++	÷	÷
	20°	+++	+++	÷	+++	÷	÷

Agglutinationsversuche mit quantitativer Ausmessung den Reaktionen bei verschiedenen Temperaturen.

Temperatur, »Kälte« agglutinine, geben kann, kann oft nur in solchem Serum (S.^{37°}) sich nachgewiesen werden. Wenn man eine Titrierung unternimmt, zeigt sich auch ein deutlicher Unterschied zwischen S.^{37°} und S.^{20°}, indem S.^{37°} einen höheren Titer z.B. bei 0° C. erweist als S.^{20°}. (Tafel Nr. 1 und 2.)

Tafel Nr. 3.

Nr.	Blutkörperchen:										
	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	
Serum ₆₃ 37° uv.	÷	÷	+++	+++	÷	÷	÷	+++	÷	÷	0° C.
» »	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	++	÷	÷	20° C.
Serum ₆₄ 37° uv.	÷	÷	+++	+++	+++	÷	÷	÷	÷	+++	0° C.
» »	÷	÷	+++	++	+++	÷	÷	÷	÷	÷	20° C.

Agglutinationsversuche bei verschiedenen Temperaturen.

uv. = unverdünntes Serum.

+++ = kräftige Agglutination.

Tafel Nr. 4.

Temp.	positive Reakt. in allem.	„37°“ — Sera Titer:					positive Reakt. in allem.	„20°“ — Sera Titer:				
		1	2	4	8	16		1	2	4	8	16
0°	21	8	5	4	3	1	14	6	4	3	1	÷
5°	20	8	4	4	3	1	13	5	4	3	1	÷
10°	18	6	4	4	3	1	13	5	4	3	1	÷
15°	13	5	3	2	2	1	10	5	3	1	1	÷
20°	9	4	2	1	1	1	8	4	2	1	1	÷

Gesammelte Übersicht über Agglutinationsversuche mit positiver Reaktion. Die Zahlen geben die Anzahl der Sera an, welche den betreffende Titer darbieten.

Wenn die Temperatur erhöht wird, verschwindet die Reaktion in S.^{20°} oft. Bei 0° C. sieht man oft einen deutlichem Unterschied in Titer S.^{37°} und S.^{20°}. (Tafel Nr. 2). Weil sich herausgestellt hat, dass es in Serum Antistoffe gibt, die nur bei niedriger Temperaturen wirken, wird dann die nächste Frage, ob nur die Rede von allgemeinen »panagglutinierende« »Kälte« agglutininieren oder von Antistoffen ist, die nur mit gewissen Blutkörperchen der Individuen reagieren, also type-

spezifische Isoagglutinine, die nur bei niedriger Temperatur wirkt?

Die meisten der früher genannte Autoren haben in der Regel ihre Untersuchungen bei Zimmertemperatur unternommen und mit Sera bei der gleichen Temperatur (?) ausgeschieden.

Aus meinen früher erwähnten Versuchen gibt es hervor, dass die hohe Koagulationstemperatur mehr positive Reaktionen gab, als wenn die Temperatur nur ungefähr 20° C. war. Tafel Nr. 4 gibt eine gesammelte Übersicht über die Anzahl von positiven Agglutinationen in einer Versuchsreihe von 50 Stüch. Vieh und zwischen Sera ^{37°} und Sera ^{20°}.

Bei 0° C. gibt es 21 positive Reaktionen für S.^{37°} und für S.^{20°} 14 oder 42 % bzw. 28 %. Bei steigender Temperatur nimmt die Anzahl der Reaktionen, was die beiden Gruppen betrifft, so ab dass sich bei 20° C. positive Agglutination in 18 % bzw. 16 % einstellt. Gleichzeitig damit, dass man einem höheren Titer in Serum bei 37° C. ausgeschieden findet, kann man schwache Antistoffe bei Individuen nachweisen, bei denen man sonst annehmen müsste, dass es ihnen an diesen Stoffe fehlte.

Wenn man die Agglutination bei niedriger Temperaturen untersucht, zeigt es (Tafel Nr. 3) sich bei kreuzweisen Versuchen mit 2 Sera gegenüber Blutkörperchen von den gleichen 9 Individuen, dass Serum₆₃^{37°} die Blutkörperchen₆₁₋₆₂₋₆₆ bei 0° agglutiniert, Serum₆₄^{37°} die Blutkörperchen₆₁₋₆₂₋₆₃₋₆₅ bei der gleichen Temperatur agglutiniert. Erhöht man diese bis 20° C. zeigt sich nur eine schwache positive Agglutination: S.₆₃^{37°} — E.₆₆ während S.₆₄^{37°} mit Blutkörperchen₆₁₋₆₃ kräftige Agglutination, schwachere Reaktion mit E.₆₂ gibt, während die andere Blutkörperchen sich nicht agglutinieren lassen. Tafel Nr. 3 zeigt so, dass sich Isoagglutinin in Ochsen Serum finden kann die sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Temperatur wirkt. Ferner kommt Antistoff vor, der nur bei niedriger Temperatur wirkt. Wenn man nun die Amplitude für die verschiedenen Sera untersucht, stellt es sich heraus, dass diese sehr viel variieren kann. Aus Tafel Nr. 1 und 2 gibts es hervor, dass die Amplitude for S.₆₃ — E.₆₁ bis 10° C., S.₆₃ — E.₃₂ nur

Tafel Nr. 5.

Nr:	Blutkörperchen:										Temp.
	50	54	5	56	38	48	24	57	49	37	
Serum 48	+++	+++	+++	+++	÷	÷	÷	÷	÷	÷	20° C.
„ 49	+++	+++	+++	+++	÷	÷	÷	÷	÷	÷	„
„ 57	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	„
„ 54	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	„
„ 50	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	„
„ 24	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	„
„ 56	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	„
„ 38	+++	+++	÷	+++	+++	÷	÷	+++	÷	+++	„
„ 37	+++	+++	÷	+++	÷	÷	÷	÷	÷	÷	20° C.
„ 37	+++	+++	+++	+++	÷	÷	÷	÷	÷	÷	0° C.
„ 54	÷	÷	÷	+++	+++	÷	÷	÷	÷	÷	0° C.
„ 57	÷	÷	÷	+++	+++	÷	÷	÷	÷	+++	„
„ 50	÷	÷	÷	÷	+++	÷	÷	÷	÷	÷	„
„ 24	÷	÷	÷	÷	+++	÷	÷	÷	÷	÷	„
„ 56	÷	÷	÷	÷	+++	÷	÷	÷	÷	÷	„
„ 38	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	„
„ 38	K	K	÷	÷	÷	÷	÷	+++	÷	÷	20° C.
„ 37	K	+++	÷	++	÷	÷	÷	÷	÷	÷	„
„ 49	K	K	+++	+++	÷	÷	÷	÷	÷	÷	„

Agglutinationsversuche bei verschiedenen Temperaturen.

+++ = kräftige Agglutination.

K = »Klebereaktion«.

Serum ist unverdünnt.

bis 5° C. reicht. Während S.₆₄—E.₆₃ eine Amplitude bis 20° C. hat. In einzelnen Proben erreicht die Amplitude 25°—30° C. und in einer einzelnen 37° C.

Ich habe in meiner Einleitung die Bezeichnung »A« und O verwendet und glaube, dass es zu verantworten ist, die Blutkörperchen Nr. 50—56 in Tafel Nr. 5 als »A« zu betrachten

und die übrigen als O. Es zeigt sich dann, dass bei *Senkung von der Temperatur* in gewissen Sera (Nr. 57) kommen Reaktionen vor, welche *einen anderen Faktor* als »A« zu verdanken sind. In gewissen Sera (Nr. 38) tritt eine »Panagglutination« auf, während in anderen Sera (Nr. 37) nur »A«-Reaktion durch Senkung der Temperatur auftritt, indem Blutkörperchen Nr. 5 des »A« vermeintlich schwächer als die anderen sind, und daher nur in Kälte reagieren.

Weil keine Absorptionsversuche unternommen wurden, ist es nicht zu beweisen das die Reaktion von Nr. 5 bei 0° gerade »A« zu verdanken ist, aber da keine von den anderen 6 Blutkörperchen reagieren, ist es wohl sehr wahrscheinlich, dass die Reaktion »A« zu verdanken ist. Von den typespezifischen Agglutinine abgesehen, enthalten gewisse Rindersera, wie erwähnt »panagglutinierende« »Kälte«agglutinin, indem S.₃₈ (Tafel Nr. 5) bei 0° alle Blutkörperchen, auch eigene, agglutiniert. Diese »panagglutinierende« »Kälte«agglutinin kommt inzwischen weit seltener als die typespezifische vor.

H. M. Jettmar findet bei gewissen Rindern, deren Blutkörperchen sich agglutinieren lässt, bisweilen ein ungewöhnlich starkes Festkleben von diesen an die Wände des Glases, dies trat besonders auf wenn die Gläser in längerer Zeit bei einer Temperatur von 25° C. und bis Körpertemperatur gestanden hatten. »Dieses Festkleben trat, trotz wiederholte Umschütteln so stark ein, dass die adhärente Blutkörperchenmasse, selbst bei starkem Umschütteln sich nicht von den Wände des Glases lösen liess, wobei Agglutination schwer oder gar nicht sich erkennen liess.«

Jettmar hat 0.3 ccm. Serum + 0.3 ccm. Blutkörperchensuspension (1 %) verwendet. Die Gläser bringt er bei 25° C. 1—2 Stunden an, wonach diese noch einmal umgeschüttelt werden und darauf an eine kühle Stelle die Nacht hindurch (Temp.?) hingestellt werden und das Resultat wurde den nächsten Morgen abgelesen. Dieses eigentümlichen »Festkleben« habe ich nicht in den mir zugänglichen Litteratur bei anderen Autoren beschrieben sehen. Die Reaktion habe ich oft in meinen Versuchen gesehen, und die trat sehr unregelmäs-

Tafel Nr. 6.

	„Festkleben“	Temp.	Agglutination	Titer
S ₃₈ —E ₅₄	+	18° C.	++ kleine Haufen	8
„ —E ₅₀	+	„	++ „ „	8
S ₃₇ —E ₅₄	+	„	++ „ „	1
„ —E ₅₀	÷	„	++ grossen „	1
S ₄₉ —E ₅₄	+	„	+++ kleine „	4
„ —E ₅₀	+	„	+++ „ „	1
S ₄₈ —E ₅₄	÷	„	++ grossen „	8
„ —E ₅₀	÷	„	+++ „ „	2

Agglutinationsversuche die Beispiele für »Klebereaktion« darbieten.

Tafel Nr. 7.

Nr.	Serum ₄₉ unverdünnt gegenüber Blutkörperchen:							Temp. 18° C.
	38	54	50	37	5	56	57 59	
Agglutination	÷	+++	+++	÷	+++	+++	÷ ÷	
„Klebereaktion“	÷	K	K	÷	÷	÷	÷ ÷	

Agglutinationsversuche die »Klebereaktion« in einem einzelnen Serum zeigen.

sig auf. Gewisse Blutkörperchen klebten in einer Reihe von Sera, z.B. Blutkörperchen₅₀ in Sera₃₇₋₃₈₋₄₉, während Blutkörperchen₅₄ nur in Sera₃₈₋₄₉ klebten, aber von S₃₇ agglutiniert wurden. (Tafel Nr. 5—6). In Tafel Nr. 7 ist das Verhältnis einer einzelnen Serums einer Reihe von Blutkörperchen gegenüber angeführt, es zeigt sich, dass die Serum₄₉, sowohl Agglutination als auch »Klebereaktion« geben können. Diese eigentümliche Reaktion trat nach kurzer Zeit (von einigen Minuten bis za. ½ Stunde) ein, wenn Serum und Blutkörperchensuspension vermischt war, man sah da dieses »Festkleben« von den Blutkörperchen wie kleine recht gleichartige

Haufen an den Wände des Glases. Selbst bei recht starkem Umschütteln konnten die Haufen nicht gelöst werden und nach Verlauf einiger Stunden bei Zimmertemperatur konnte das blutkörperchenfreie Serum abgegossen werden. Dieses »Festkleben« zeigte sich sowohl in den niedriger als auch in den höheren Serumverdünnungen (Tafel Nr. 6). Bei der stärkeren Verdünnung die Blutkörperchen lösten sich und man sah dann eine allgemeine Agglutination, ein ähnliches Bild trat bei steigender Temperatur vor, während die Blutkörperchenhaufen sich lösten (erst in den stärkeren Verdünnungen) und da entstand eine Agglutination mit einem etwas minderen Aggregat als sich in der Regel findet.

Die unternommenen Untersuchungen dürfen nur als von einer orientierende Art betrachtet werden, während ich keine Gelegenheit gehabt habe, Absorptionsversuche darzustellen. Aber ich meine diese Schlussfolgerung ziehen können, dass die Serumausscheidung bei 37° C. vorgehen muss und dass die Agglutinationsversuche auch bei niedriger Temperatur unternommen müssen.

Zusammenfassung.

- 1) Die ausgeführten Agglutinationsversuche zeigten, dass ein recht bedeutender Unterschied besteht von der Isoantistoffgehalt in Serum bei 37° C. bzw. 20° C. ausgeschieden.
- 2) In Serum^{37°} kann man zuweilen solche schwache Antistoffe nachweisen, die keine sichtbare Agglutination in Serum^{20°} gibt.
- 3) In gewissen Rindersera findet man Isoantistoffe die bei sowohl niedriger als auch höher Temperatur wirken kann, und dass die Amplitude für diese sehr viel variieren kann.
- 4) Gewisse Rindersera enthalten typespezifische Isoantistoffe die nur bei niedriger Temperatur aufgezeigt werden können.
- 5) Rindersera enthalten ab und zu »Panagglutinine«.
- 6) Die »Klebereaktion« ist beschrieben, diese kommt nicht

regelmässig vor und verschwindet in den stärkeren Verdünnungen und bei Temperatur über 20° C.

Herrn *Prosektor Dr. med. V. Friedenreich* bin ich für gütige Beihilfe und Anleitung zu hohem Danke verpflichtet.

SCHRIFTTUM.

- Berndt, E.*: A. f. Landwirtschaft Bd. 1. 728 (1929).
Bonier, Jörpes und Sköld: Z. f. Tiersucht u. Züchtungsbiologie Bd. 13 364 (1929).
Brockmann, H.: Z. f. Immunf. u. exp. Therapie Bd. 9 98 (1911).
Clarenburg: cit. Hirszfeld (l. c.)
Fetth, G.: D. t. Wehschrft. Bd. 39 268 (1931).
Fischbein, M.: cit. O. Thomsen (l. c.)
Hirszfeld, L. und W. Halber: Z. f. Immunf. Bd. 59 33 (1928).
Hektoen, L.: cit. O. Thomsen (l. c.)
Hofferber, O. und S. G. Winter: A. f. prakt. u. w. Tierheilkde. Bd. 64 424 (1932).
Hardt, O.: Mdskrft. f. Dyrlaeger Bd. 50 99 (1938).
Karshner, V. M.: cit. O. Thomsen (l. c.)
Kayser, W.: A. f. w. u. prakt. Tierheilkde. Bd. 59 99 (1929).
Lodemann, G.: Z. f. Züchtung u. Züchtungsbiol. Bd. 27 207 (1933).
Ottenberg und S. Friedmann: cit. O. Thomsen (l. c.)
Panisset, L. et J. Verge: C. r. d. l. soc. d. biol. Bd. 87 871 (1922).
Rang: cit. Lodemann (l. c.)
Schermer, S.: Hbd. d. Erbbiologie d. Menschen Bd. 6 316 (1940).
Todd, C. & White, R. G.: Journ. of hygiejne Bd. 10 185 (1940).
Thomsen, O.: P. Steffan: Hdb. d. Blutgruppenkde. 1935.
 — Universitetets Festskrift 1935.
Witebsky, E. & K. Okabe: Klin. Wochenschrft. 1095 (1927).
Winter, S. G.: Ref. in Stang u. Wirth: Tierheilkde. u. Tierzucht Bd. 11 402 (1937).
Weszecksky, O.: Biochem. Z. Bd. 107 166 (1920).

ON THE METASTASIS PROBLEM.

By *Jorgen Ostensfeld.*

(Received for publication October 10th 1941).

The present work is a detailed study on the fate of tumor cells in organisms inoculated with transplantable carcinoma.

Transplantable tumors metastasize but exceedingly seldom. At any rate, this applies to the Frankfurt strain of the Ehrlich mouse carcinoma, which will be dealt with here. As a general rule, this tumor strain may be said now and then to have metastasized in the very earliest passages, while for a good many years no metastasis has been seen.

In 1927 and following years, however, *Blumenthal* and collaborators and a number of other investigators demonstrated that transplantable tumors might be transmitted by homologous transplantation of apparently metastasis-free organs, and it was only natural, then, that the idea of a virus should turn up, as this phenomenon had to be explained somehow.

In contrast hereto, other authors (*c. g., Jonescu*) believed that in the blood of tumor-bearing animals they had observed cells of such a character that they did not hesitate to stamp them as tumor cells. Consequently, *Jonescu* looks upon a cancer virus as improbable.

In attempts to explain the above-mentioned phenomenon, investigators thus divided themselves at once into two camps, some of them maintaining the existence of a cancer virus, while others considered it more likely that the takes in transplantation of apparently metastasis-free organs would be attributable simply to the circumstance that the presence of tumor cells in the organs concerned had been overlooked.

The dokumentations presented by both camps in support of their theories have been rather vague, however, so that it seemed justified and desirable to undertake some new more comprehensive experiments concerning this problem.

The *tumor strain* employed in the experiments here reported is the Ehrlich mouse carcinoma, which has lived as transplantation tumor for nearly forty years. The *percentage of takes* in the animals here employed (white male mice of common Danish stock) has constantly been 100. Altogether 328 animals have been inoculated with this strain through 14 passages, and every inoculation has turned out a take. *Histologically*, the tumor is a solid carcinoma interspersed with minor adenomatous areas.

Technique of Inoculation. — Tumor tissue is removed sterily from killed animals, cut into tiny pieces and then mixed with a little Ringer's solution. The resulting »tumor mush« is withdrawn into a 2 cm. syringe, and injected subcutaneously in the chest or back of the animal. The *latent period* for takes has always been 10 days or less, that is, with the *dose* here employed (about 0.2 cc. of the »tumor mush«).

The *fundamental experiment*, which was aimed to show whether the experiments outlined above really were reproducible, was carried out as follows: 25 tumor-bearing mice were killed at various intervals after the subcutaneous inoculation with the Ehrlich carcinoma. The lungs, heart, spleen, liver, kidneys and brain were removed. These organs were then cut into tiny pieces and injected subcutaneously into other animals.

The following doses were employed for each animal:

- 1 lung,
- or $\frac{1}{2}$ heart,
- » $\frac{1}{2}$ spleen,
- » $\frac{1}{2}$ or $\frac{1}{3}$ liver,
- » 1 kidney,
- » $\frac{1}{2}$ brain.

Thus, 12—13 mice were used for each »starting animal«. All organs were examined closely for macroscopic metastases. None were seen.

No other control examination was made.

The observation period in this, as well as in all the following experimental series, was at least 3 months.

The results obtained in these series were as follows:

6 takes after injection of lung					distributed on 7 tumor-bearing »starting animals«.
2	»	»	»	» heart	
2	»	»	»	» spleen	
1	»	»	»	» liver	
1	»	»	»	» kidney	
0	»	»	»	» brain	

In principle, then, the fundamental experiments of Blumenthal are reproducible.

The question then arises whether the takes obtained in these cases are due to overlooked metastase. In the following experiment, therefore, 25 pairs of lungs from tumor-bearing mice were examined microscopically in intermittent serial sections (2 sections per $\frac{1}{4}$ mm. of the paraffin block). The animals were killed at different times after the inoculation. This examination was limited to the lungs because lung tissue appears to give more takes than other organs. *No metastasis was found.*

Then, for the sake of additional control, quite the same series of experiments as outlined above was carried out merely with this difference, that about one-fourth of the recorded dose of organ was set aside for control microscopy (serial sections) if the remaining three-fourths of the dose gave a take. The results were as follows:

4 takes after injection of lung					distributed on 4 tumor-bearing »starting animals«.
0	»	»	»	» heart	
0	»	»	»	» spleen	
0	»	»	»	» liver	
0	»	»	»	» kidney	
0	»	»	»	» brain	

The respective specimens of lungs showed no metastases on examination in serial section.

For the last years different authors (*Fischer, Heide-Jorgensen*) have shown, that *autotransplantation* of healthy active mamma tissue sometimes may cause tumor-growth. Considering the theory, that *homologus* transplantations of healthy organs might give the same results, furthermore a serie of control experiments is made, in which lungs, heart, spleen,

liver, kidneys and brain from 25 healthy mice are transmitted subcutaneously in other mice. Dose and number of animals used are quite as in the experiments mentioned above.

In this serie of experiments there were no takes.

In principle the same results as were obtained with the Ehrlich mouse carcinoma were produced also in analagous experiments with another transplantable carcinoma and with a sarcoma produced with dibenzanthracen.

Thus it is demonstrated with *preponderant probability* that the mentioned transplantable tumors may be transmitted by inoculation of apparently metastasis-free organs. The tumors resulting in this way show quite the same properties as the tumors of the »starting animals« (histological features, transplantability). More likely, the *lung* is that organ which most often gives a take, and it seems reasonable to think that the number of takes is dependent upon the given dose of organ (cf the first and second series of experiments).

How are these takes after inoculation with apparently metastasis-free organs to be explained? Are they due to a virus or to tumor cells that have been missed in the microscopic control examination? Our experiences so far have shown that viruses are resistant to very high X-ray doses (30,000—40,000 r), whereas tumor cells are killed by this dose. So it seems obvious to make use of this fact as a probable indicator as to whether the takes in the previous experiments involved a virus or »concealed« tumor cells.

Accordingly, the next experimental series was carried out with the following technique: 100 mice were inoculated subcutaneously in the usual manner with Ehrlich's mouse carcinoma. The animals showing a take were irradiated in vivo at varying points of time after inoculation with a dose of 6000 r — a dose that is known in all probability to kill the tumor cells in the transplanted tumor tissue. Immediately after the irradiation the animals were killed, and the lungs were removed and injected subcutaneously into other animals. In these experiments the dose was 2 lungs per animal. Thus 100 pairs of lungs from 100 X-ray-treated tumor-bearing mice

were transplanted subcutaneously into 100 mice. *No take* turned up in any of these cases.

This indicates *decisively* that the takes obtained previously on inoculation with organs were due to the presence of *tumor cells*.

For the sake of additional certainty, furthermore, from 25 tumor-bearing animals some tumor tissue was removed immediately after the X-ray treatment and transplanted subcutaneously in the usual manner and dosage into 25 other animals. *Here, too, there was no take*, notwithstanding that the percentage of takes under optimal conditions previously was found with certainty to be 100.

This finding shows plainly that 6000 r is above the lethal dose for the tumor cells in the Ehrlich mouse carcinoma.

Now we have got so far that the following can be considered established: the Ehrlich mouse carcinoma may be transmitted by apparently metastasis-free organs. Evidently this transmission is due to the presence of tumor cells in the injected tissue.

Again we meet with the question about overlooked metastasis. In order to throw some additional light on the question, a new series of experiments was carried out under the hypothetical consideration: if the first experiments are repeated with this modification, that the dose of inoculated lung tissue is lowered to $\frac{1}{4}$ lung (instead of 1 lung), what will be the conclusion on the appearance of takes, and what will be the conclusion in the absence of takes? If a take is observed merely in one case among a fairly large number of animals, it will be reasonable to assume that a metastasis has been transplanted — in the sense of *actually organized tumor tissue* of the same character as the primary tumor.

If no take appears, it seems most reasonable to think that the tumor cells have been scattered diffusely throughout the lung tissue and that the given lung dose ($\frac{1}{4}$ lung) has not contained tumor cells enough for a take. As is well known, it requires a certain minimum of tumor cells to give a take on subcutaneous transplantation.

The next experiment was carried out in this way; 50 tumor-bearing mice were killed at varying points of time after the inoculation. One-quarter of each lung (from different parts of the lung) was then injected subcutaneously into a normal mouse — 100 mice being thus inoculated each with $\frac{1}{4}$ lung from the 50 tumor-bearing mice. *No take appeared in any of these cases.* As mentioned, this result indicates a diffuse scattering of the tumor cells in the lungs, more likely in the lung capillaries.

Like several previous authors, I succeeded in demonstrating that living tumor cells actually were present in the blood stream, as 2 out of 50 cases showed a take after subcutaneous inoculation with $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ cc. of blood from tumor-bearing animals.

But, is it conceivable that the number of tumor cells required for a take may escape demonstration on microscopic examination of serial sections of the lung tissue? Considering this question, it is necessary to know approximately the number of tumor cells required for a take with the given technique.

For the Ehrlich carcinom under the present experimental condition, this number has been between 100,000 and 250,000 cells. This result was obtained experimentally as follows: a stock emulsion of tumor cells in Ringer's solution is made, and the number of cells per unit of volume is determined (by means of a counting chamber). On this basis, other emulsions are then prepared with varying numbers of tumor cells per unit of volume; and by inoculation of these emulsions it is found how many tumor cells are required to give a take.

When, further, we know that a mouse lung roughly estimated contains about 200 million cells (number of nuclei in ordinary sections multiplied by the number of sections making up the lung), it does not seem inconceivable that the cells may escape demonstration, especially when they are scattered diffusely in the lung tissue.

It is to be kept in mind, however, that tumor cells scat-

tered about in the organs quite conceivable may possess a higher degree of »virulence« than the general average of tumor cells. The very fact that they exist in active form lends some support to this view. And if this be correct, it is obvious that the minimum of tumor cells required for a take thus can be cut down.

Now, the objection might perhaps be raised that the obtained results are artificial products. For, with the usual technique here employed, in a few cases the inoculation of lung tissue has resulted in takes appearing respectively 1 and 4 days after the subcutaneous inoculation with tumor tissue (4 out of 94 cases). The explanation of this might conceivably be: that the tumor cells, which are inoculated as tiny particles are readily drawn into small capillaries and lymphatics of the subcutis, wherefrom they soon reach the lungs. In other words, it may be that the previous experimental results can be attributed entirely to the inoculation technique employed, so that they by no means allow of generalization.

A probable proof of the view that the spreading of tumor cells largely proceeds from the actually invasive cancer tumor is found in the following observation: If the transplantation is performed *operatively* with implantation of larger individed pieces of tumor, *no* take is obtained of implantation of lung tissue 1 and 4 days after the subcutaneous inoculation of tumor (respectively 0 out of 17 cases, and 0 out of 18). If, on the other hand, the subcutaneously inoculated tumor is growing vigorously (about 14 days after the inoculation), takes may again be obtained on injection of lung tissue (4 out of 15 cases).

It seems to me that this observation indicates decidedly that the tumor cells scattered about in the organs must come from the invasive tumor growing in the subcutis.

As a matter of fact, a subcutaneous transplant will very soon show signs of growth, as mitotic figures have been observed in the transplant within 48 hours, and ingrowth of fibroblasts and capillaries within 72 hours (*Bashford, Russell*). This, too, lends some support to the above explanation.

We have now got so far that it is justifiable to take the following stand: A growing transplantable tumor gives off cells that probably are scattered about everywhere in the organism. *But, then, why are metastases never seen in the respective organs?*

Conceivably the fate of these tumor cells may take the following course:

- 1) The tumor cells can deteriorate and perish.
- 2) The tumor cells lead a latent existence without further development.
- 3) Metastasis requires a long time.

In order to elucidate the last possibility, a series of experiments was carried out in which the well-developed primary tumor was removed radically by operation. Thus the animals were »cured«, and it was possible to observe what would happen to them in a considerable length of time. Under »normal« conditions the tumor-bearing animals die in 2—5 weeks after the inoculation.

Radical extirpation of a tumor from the subcutis of the chest or back of the mice is so difficult that it was given up beforehand. In the following experimental series, the tumor tissue was inoculated on the tail. In such cases the radical removal of the tumor by operation is easy. Then it was found that in a certain experimental series, 4 out of 26 animals ultimately showed development of *macroscopic multiple metastases to the lungs*, in one case there was also a metastasis in one kidney. The lifetime of these 4 animals after removal of the inoculated tumor varied from 1.5 to 4 months. They died simply because no practically functioning lung tissue remained.

After these findings it is most probable that the previously reported absence of metastases in animals with an established malignant tumor simply is due to the fact that *there has not been time enough for the metastases to develop*, because the animals died of the inoculated tumor beforehand. The absence of metastases in the other cases may be explained by reference to the other two suggested theoretical possibilities of the fate

of the tumor cells. In conclusion, mention is to be made of an experimental series in which the animals were killed two months after radical extirpation of the inoculated tumor and the lungs were injected subcutaneously into other animals. A take was observed in 1 out of 21 cases. In another series of animals, inoculated with the same tumor and in the same manner and given the same operative treatment, the mice were painted with 0.5 % methyleholantren in benzine on different parts of the skin (*Murphy and Sturm*) — from the day of the operation till they were killed — and in this series takes were obtained in 10 out of 20 cases. Thus it might look as if methyleholantren was able either to activate the tumor cells so much that their taking capacity was increased, or to lower the resistance of the organism so much that the tumor cells in this way were able to prevail over the normal tissue.

If the animals were painted with methyleholantren for 2 months after the radical removal of the inoculation tumor, and then were left untreated for 4 months, no metastasis was seen, neithed macroscopically nor microscopically (intermittent serial sections) in a group of 13 animals.

These experimental series are small, it is true, but their interesting results invite to further studies on the influence of methyleholantren on organisms that may be assumed to contain tumor cells.

Summary.

1. Transplantable tumors may be transmitted by homologous transplantation of apparently metastasis-free organs from tumor-bearing animals.

2. Of the various organs, the lung is the one that most often gives the take (retention of tumor cells in the lung capillaries).

3. The number of takes seems to depend on the dose of organ employed.

4. The course of the take is to be looked for in the tumor cells scattered diffusely in the respective organs. It is *not*, a question of any cancer virus.

5. When the organ dose is decreased considerably, *no* take appears.

6. Active tumor cells are demonstrated in the blood stream.

7. The number of tumor cells required for a take probably may readily escape observation, even on thorough microscopic examination of the tissue.

8. Probably the tumor cells present in the organs originate from the invasive inoculation tumor in the subcutis. A small number of these cells may possibly have been carried to the organs at the time of the inoculation or very soon after.

9. In a few cases the prolongation of the life of the animals by radical removal of the inoculation tissue gives rise to the formation of metastases in the lungs, undoubtedly because in these cases there has been *time enough* for the metastases to develop. A large part of the tumor cells may reasonable be assumed to perish or live in a latent state for some length of time without attaining further development.

10. Methylcholantren appears to some extent to be able to shift the balance between tumor cells and the organism of their host.

Addendum.

The account of the work here presented, it has to be admitted, is very summary in its form. Readers interested in the subject may be referred to my dissertation for the doctorate: »Om Svulstcellers Spredning i Organismen«, Nyt Nordisk Forlag — Arnold Busck, Copenhagen, 1941, in which details are given of the technique and demonstrations, besides a comprehensive list of literature.

The expenses connected with the investigations here pre-

sented have been met in part by grants from the National Association for the Combating of Cancer, from Generalkonsul Ernst Carlsens og Hustrus Legat for the Combating of Cancer and from Anna Fuller's Fond.

THE OCCURRENCE AND MODE OF TRANSMISSION OF TULAREMIA IN SWEDEN.

By *Gunnar Olin*, M. D.

(Received for publication November 8th, 1941).

The first certain cases of tularemia in Sweden were diagnosed by *Granström*^{5,9)} in the beginning of 1931. Since then we have learned so much about the occurrence of this disease and the conditions favoring its development and spread, especially through the great epidemics of 1938, that the following summary of our experience should be of interest. I shall also take the opportunity of reporting some interesting observations made in 1938 in regard to the mode of transmission of the disease, of which only a preliminary account has yet been published.¹⁷⁾

I. Survey of the distribution and frequency of tularemia.

During the ten years following the first observations of 1931, other cases of this disease in man have been observed in 1934, 1937, 1938, 1939, 1940 and 1941. Table 1 gives the number of cases in these seven years and their distribution in the different epidemic regions. It is seen that the disease increased steadily until 1938, when there were 313 cases, and then rapidly decreased. About 600 cases altogether are known. This figure includes all the patients who sought medical advice and in whom the disease was diagnosed by bac-

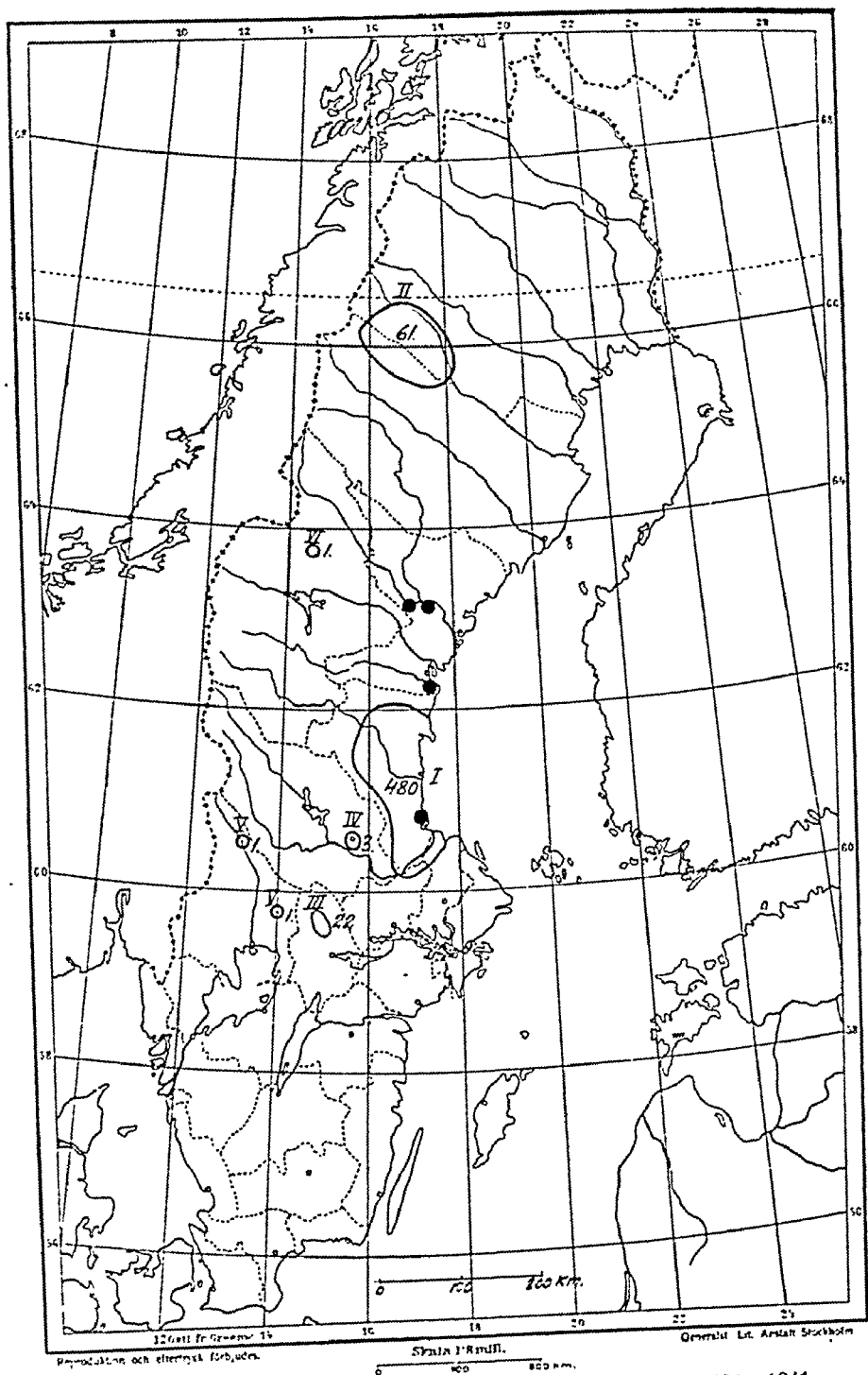
teriology examination or who were reported as having tularemia because of a typical clinical picture, as well as the cases discovered during epidemiologic field studies. As the latter studies were not always concentrated on tracing every possible case and as probably many patients, especially the ones with mild symptoms, did not consult a doctor, it may be reckoned that 600 far from represents the real number of cases occurring during this period.

If we study the distribution of tularemia in different parts of the country, we see at once that one district in particular has borne the brunt of this disease. The Gävleborg county and surroundings have had no less than 490 cases. The extent of this epidemic focus is shown in map 1, which also shows the place of the other, smaller foci and that of the solitary cases. The Stockholm cases were excluded, as they were all infected from one hare whose home district is unknown. In order to complete the picture of the distribution of tularemia in this country, the places are also marked on the map where infected hares were found: in 1931 2 animals in the neighborhood of Sollefteå, in 1933 a hare from Svartvik near Sundsvall and in 1936 a hare from Strömsbro near Gävle.¹⁸⁾ The last mentioned place is the only one in a region which also had human cases.

Of the different epidemic foci, only the largest, the Gävleborg focus, had cases in all the tularemic years in the eleven years period. Thus the infection there was of distinctly endemic nature. The other foci were only represented one or two of the years, as a rule. That the disease tends to be endemic is also indicated from the observations in Lindesberg: after the epidemic of 1931, there were two more cases in 1940 in the same district.

II. The occurrence of tularemia in animals.

As known, tularemia in man can always be traced back to the occurrence of tularemia in the animals of the district. Thus it is of basic importance to know what animals are



Map 1. The distribution of tularemia in Sweden 1931—1941.
 (Regarding the figures compare with table 1. The black spots represent
 cases of tularemia on hares.)

subject to the disease in this country. Earlier research^{15,16,18)} showed that tularemia occurs naturally in the Swedish hare (*Lepus timidus*). *B. tularense* was isolated in four cases of hares found ill or dead in the fields. As mentioned, the places where they were found are seen in map 1.

There is other evidence of the occurrence of this infection in hares. Some of the patients who suffered from tularemia are known to have been in contact with a sick or dead hare two or three days before falling ill. The primary lesion in these cases was on the hands, which points strongly to the infection originating from the animal. All of these cases, 12 in number, are shown in table 1 (the first figures in brackets). Judging by these cases, this infection has occurred among the hares in the majority of the tularemic foci in the country. In the Gävleborg focus (I) six persons were infected from hares, three of them from the same animal, and one person in each of the Kopparberg (IV), Värmland (V) and Jämtland (VI) counties was infected in the same way. The three Stockholm cases were infected by one and the same hare, whose origin is unknown. These cases in man show that eight hares in different parts of the country suffered from tularemia.

Another rodent in which tularemia is suspected to occur is the squirrel (*Sciurus vulgaris*). It was in the ground squirrel (*Citellus beecheyi*) that McCoy¹⁴⁾ first demonstrated the infection. It has never been proved, either here or in other countries, that tularemia occurs naturally in the species of squirrel which inhabits Sweden. Information gathered from the Lindesberg epidemic of 1931, however, indicates that the squirrels of the district were infected. Two of the persons with the disease had skinned one of these animals two or three days before falling ill. One of the squirrels was obviously ill and had been killed by a blow from a cane (Olin and Sehlfstedt²⁰). It has also been shown experimentally that the Swedish squirrel is readily infected by tularemia, and that the infection leads to death in a few days. Typical changes in the spleen and liver are demonstrable.¹⁶⁾

Table 1.

The distribution and localization of the tularemia cases during the years 1931 to 1941.

(The first of the figures in brackets represents the number of patients who had been in contact with hares, the second the ones in contact with squirrels or rats. The other patients had not been in contact with rodents.)

	Epidemic region	1931	1934	1937	1938	1939	1940	1941	Total
I	The Gävleborg county and bordering parts of the Västmanland and Uppsala counties	3 (3)	48	115(3+1)	252(0+3)	55	7	10	490 (6+4)
II	Arjeplog and Sor-sele parishes in Lappland				60	1			61
III	The Lindesberg district in the Västmanland county	20(0+2)					2		22 (0+2)
IV	The Falu region in the Kopparberg county	2 (1)	1						3 (1)
V	The Värmland county, Fastnäs and Filipstad	1 (1)	1						2 (1)
VI	Hammerdal in the Jämtland county				1 (1)				1 (1)
VII	Stockholm	3 (3)							3 (3)
Total		29(8+2)	50	115(3+1)	313(1+3)	56	9	10	582(12+6)

Rats, too, may be suspected of harboring tularemia. *Dieter* and *Rhodes*²⁾ demonstrated the condition in at least three of a number of rats caught in Los Angeles. They also found that both wild and tame rats could be infected experimentally, the disease ending in death in 65 per cent of the cases. *Lillie* and *Francis*¹⁰⁾ showed that *Rattus norvegicus albinus* can get

the disease, although it is less sensitive to it than most other rodents. Epidemiologic observations in our country also indicate that humans may occasionally receive the infection from rats. In four of my cases, the patient had been in contact with living or dead rats shortly before falling ill. One case which occurred in March of 1938, thus not during the common season (see later on), is particularly elucidating. The patient, a boy of ten years, had his right thumb bitten by a rat seven to ten days before he fell ill. The rat took such a firm grip with its teeth that it had to be torn away. The disease picture was typical, the seroreaction was positive and *Bacterium tularensis* were found both in the secretion from the primary lesion on the thumb and in the pus from an inflamed gland in the right axilla. It was not possible to examine the rat in this case, or in any of the others. All four cases, however, occurred in the tularemic region of the Gävleborg county in which the general nature of the infection gave great possibilities for its spread to the rats as well. Furthermore, one of the patients from 1940 in the Lindesberg district, who had the oculo-glandular form of the disease, is said to have torn up an empty rat nest some days before falling ill.

Another animal which is thought to spread the disease in Scandinavia is the lemming (*Lemmus lemmus*). *Thjötta*²²⁾ believed that three cases of tularemia in man, which occurred in a region of Norway where the lemmings abounded, could be traced to this animal. Examination of a number of lemmings did not confirm his assumption, however. *Olin* and *Schlstedt*²⁰⁾ drew attention to this same source of infection in Sweden. According to information they had received, a number of cases of suspected tularemia in Dalecarlia in 1924 occurred simultaneously with a great prevalence of lemmings. However, the nature of the disease in these cases was never definitely proved.

The older literature contains a very interesting investigation from Norway, published by *Horne*⁶⁾ in 1912. This author described bacteriologic studies of lemmings carried out in 1896 and 1903. He succeeded in producing an infection in different animals, like the

white mouse, rabbit and guinea pig, by inoculating them with material from dead lemmings. Judging by his description, this infection might well have been tularemia. The course of the infection and the pathologic changes pointed to this condition. The small bacteria which he found in the internal organs of both the lemmings and the experimental animals also resemble the bacteria of tularemia. It is noteworthy that the bacteria he found could not, or only exceptionally, be cultivated in ordinary media. Since *B. tularensis* was not known at the time of his investigation, it is not possible to judge the connection of the infection with tularemia, and no definite conclusions can be drawn from his observations. *Horne* did not say whether there were any cases of disease among the people of the regions from which the infected lemmings came. On the other hand, he did say that there were reports from several doctors in the official medical statistics of Norway regarding the occurrence of an epidemic fever in the people of regions visited by migrations of lemmings.

Although tularemia was recognized to be a question of domestic interest in Sweden in 1931, it was not possible until 1938 to investigate whether lemmings played any role in its distribution. For it was not until then that lemmings began to increase to such an extent that large migrations were to be expected. Information was procured during the early summer of that year regarding the occurrence of lemmings in the regions close to the mountains, so that a suitable region could be chosen for investigations. Several places spoke of a great abundance of lemmings and, of these, Arjeplog was finally selected.

While preparations were being made for the trip to Arjeplog, the physician there, Dr. *E. Wallquist*,*) reported that cases of disease, reminiscent of tularemia, had begun to appear in the district. Serologic examination soon confirmed his assumption. During the continuance of the study, not less than 60 cases of tularemia were observed in the parishes of Arjeplog and Sorsele. They all occurred during the period July 15 to Aug. 29, 1938, in a region about ten thousand square kilometers in size.

*) The author is greatly indebted to Dr. Wallquist for his interested and kindly help.

An examination of the lemmings in this region was begun in September. At this time the animals had already begun to decrease, but there were still a great number in certain parts. About one hundred and fifty lemmings were caught in different places. Eleven animals found dead in the fields were also collected. The latter were immediately autopsied and, if changes indicative of tularemia were found, guinea pigs were inoculated subcutaneously with a suspension of the spleen crushed in a mortar. The trapped lemmings were kept in cages and not examined until they died. The mortality was high, probably partly because the animals were first fed on damp herbage, which they did not seem to tolerate. The ones which died in captivity were also autopsied and guinea pigs inoculated in the aforementioned manner if changes were observed. Altogether 19 guinea pigs were inoculated.

Two lemmings found dead in the same region showed a slightly enlarged spleen of grey-red color and fairly firm consistency. One of them also had a slightly enlarged lymph gland in the right groin. The guinea pig inoculated with a spleen suspension from these two animals was killed on the third day, as it showed distinct signs of disease. Autopsy revealed the typical lesions of tularemia and *B. tularensis* was isolated from the spleen.

Four lemmings caught in another place were already dead when they got to Arjeplog. One of them showed the same alteration of the spleen as the two animals just mentioned. A spleen suspension from all four animals was inoculated into one guinea pig, which was killed in death agony on the third day. Autopsy showed the typical picture of tularemia and *B. tularensis* was isolated both from the blood and spleen.

Another three guinea pigs inoculated from lemmings which died after a half to a day and a half in captivity, fell ill three to six days after the inoculation and showed typical signs of tularemia on autopsy. *B. tularensis* was isolated from the cardiac blood and spleen of these animals as well.

Thus this investigation gave five strains of *B. tularensis* after guinea pig inoculation, which strains originated from

lemmings captured or found dead in three different places in the region where the tularemic epidemic had visited the human population. The greatest distance between the places they were caught is hardly more than seventy-five kilometers.

The strains isolated from the lemmings agreed completely as regards morphology and mode of growth with the ones isolated in other tularemic epidemics in Sweden. The strains also agglutinated to the titer limit of the anti-tularensen serum.

To test the sensitivity of lemmings to tularemia under experimental conditions, lemmings were procured from another part of the country, namely the Funäs valley in Härjedalen. Two of the animals were inoculated subcutaneously with 1/100 of a loop of one of the lemmings strains, and two others with the same dose of a tularensen strain isolated the same year from humans during the Gävleborg epidemic. One of the first two lemmings died three days later, the other four days later and the last two died three days afterwards. All four lemmings had an enlarged, grey-red spleen, and an abundance of *B. tularensen* were isolated from the cardiac blood and spleen of all four animals. Histologic examination of the liver and spleen of these animals and of the spleen of one of the Arjeplog lemmings showed focal necrosis and granulomas of the type characteristic of tularemia in other rodents.

These investigations showed for the first time and beyond all doubt that tularemia may occur naturally in lemmings, and that it leads to their death within a few days. It is thus probable that this infection has something to do with the mass death of these animals during their so-called migratory years. However, it is not yet possible to state how prevalent the disease is among lemmings. During the migratory year of 1938, animals were obtained from other places than Arjeplog. About ten animals from Härjedalen and about twenty from Duved in Jämtland were examined, but none of them showed tularemia. This fact, as well as the absence of tularemic epidemics in the population in the extensive regions outside the Arjeplog district to which an equally large, if not

larger number of lemmings migrated, would indicate that the disease may not be common in this animal. At any rate, it is not likely that tularemia is the main cause of the high lemming mortality.

After the field studies in Arjeplog were concluded, a number of lemmings were transported to Stockholm. Three of them died of tularemia, as verified by isolation of the bacteria. Two of these lemmings harbored altogether about fifty fleas of the same appearance. They were all captured and one was sent to Professor *Karl Jordan* (Kring, England) who found it to be a specimen of *Megabothris rectangulatus* (*Wahlgren*, 1903). In order to determine whether the infection could have been spread by these ectoparasites, two experiments were done. Twenty fleas were pounded together in a mortar, suspended in physiologic saline solution and inoculated subcutaneously into two guinea pigs. Four days later the animals showed signs of illness, autopsy showed the typical changes of tularemia and *B. tularensis* was isolated from the spleens of the animals. This proved that the fleas were infected with these bacteria. As the second experiment, twenty fleas were let loose on a guinea pig. They disappeared rapidly into its coat. It remained healthy for twenty-four days, however, and autopsy showed normal conditions. A similar experiment, in which two fleas from a lemming infected with tularemia were transferred to a guinea pig likewise gave negative results. The failure to effect transmission can have been due to the fact that this species of fleas may perhaps not bite guinea pigs.

During the investigation in Arjeplog, attempts were also made to find out whether other animals than the lemming were afflicted with tularemia. As regards hares, the people of the region said that there had been a fairly large number of these animals during the spring, but that they had almost entirely disappeared during the summer. In the beginning of August, a number of dead hares were found in different places. Two of them were inspected on the spot, but they had decayed so much that examination was useless.

In a few places inside the epidemic region, rabbits had been kept in areas surrounded by water. In the beginning of the summer, they began to die off and finally practically disappeared. When I came, all that remained was a large number of skeletons and an occasional survivor. Examination of a young rabbit seven weeks old gave negative results.

It was also noted that some of the sheep which grazed in small islands in a couple of places had died from an unknown cause at the end of July. Cases of fatal tularemia in sheep have been observed in America (*Lillie and Parker*¹¹). Two of the dead sheep were dug up and examined, but the advanced decomposition made it impossible to see whether there were any pathologic changes in the internal organs. The spleens were removed for inoculation into guinea pigs, but gave negative results. But, as the tests were done six weeks after the death of the animals, the results do not exclude the possibility of their having had tularemia.

Thus no real proof could be obtained that any other animals than the lemming were visited by the tularemia plague in the Arjeplog region. It is noteworthy, however, that the mortality among hares, rabbits and sheep was uncommonly high. As these animals are extremely susceptible to tularemia, it is not improbable that the high mortality was due to this infection.

III. Ways in which the disease is transmitted to man.

Considering the great abundance of the lemmings and their penetration to close beside the dwelling places of the people in the region, it seemed probable that the human cases during the Lappland epidemic were caused by direct contact with these animals. However, careful questioning did not show this to be true in any case. Nor did the position of the primary lesion speak for this manner of infection.

It is also characteristic of the Swedish tularemic epidemics that direct contact with animals subject to the disease very seldom is the cause of the illness. As seen from table 1, such

contact occurred in only 18 of the 582 cases. The conditions are otherwise in U. S. A., where contact with rodents has always been by far the most common mode of infection (*Francis*,⁴⁾ *Foshay*⁵⁾).

It was suspected from the time of the first epidemic in our country that insects transmitted the disease.²⁰⁾ Suspicions were then specially cast upon the horse fly, *Chrysops discalis*, which had already received attention in U. S. A.⁴⁾ The observations of Americans regarding ticks as disease-carriers also seemed to be confirmed in this epidemic. Thus one of the patients said that the primary lesion developed from a tick bite.

During the following epidemics in our country, the evidence in favor of the infection being transmitted by stinging insects increased, at the same time as the importance of ticks began to fade.^{10,13,18)} All the patients stated that they did not notice any tick bite, and one should be able to depend on their information as such bites only rarely escape attention. It is more difficult for the patients to specify the kind of stinging insect which bit them in a certain place. Occasional persons were quite certain that the primary lesion developed at the site of a horse fly bite. The majority, however, said that there were no horse flies during the time prior to their illness. The season for this insect is July, and the epidemics of tularemia never reach their maximum until August or the beginning of September.

However, another type of biting insect, the mosquito, is always abundantly represented during the epidemics. They were already suspected in 1934 of spreading the disease (*Olin and Malmgren*,¹⁹⁾ *Malmgren*¹²⁾) and these suspicions were further confirmed in the epidemics of 1937 and 1938 (^{14,17)}, *Lundmark*¹²⁾). The time at which the epidemics begin is very much the same in the different years and coincides distinctly with the later stage of the mosquito season. A diagram showing the time the disease began in 435 cases where there had been no contact with rodents illustrates this point (fig. 2). All the epidemics in the middle of the country ranged from

the end of July or beginning of August to the last of September or beginning of October. The frequency maximum was generally at the end of August. The more northern Lappland epidemic, however, began in the middle of July and ended at the close of August, but the mosquito season ends

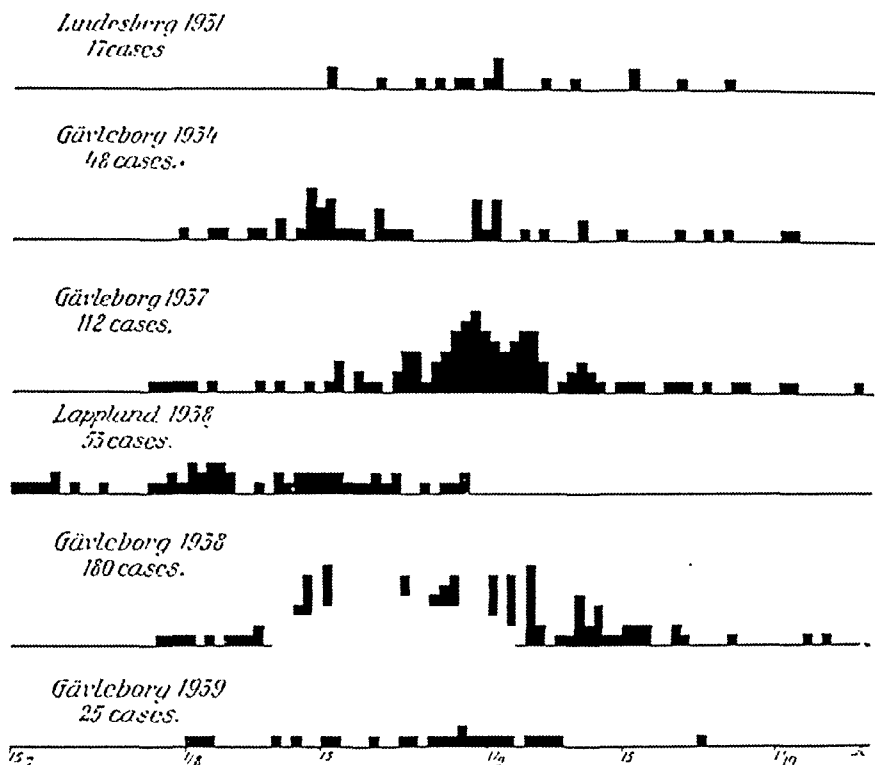


Fig. 2.

The seasonal distribution of tularemia.

much earlier in these regions than farther south. I noticed in my studies there that the mosquitoes had disappeared by the time September set in.

It may be said against the mosquito hypothesis that the epidemics of tularemia do not occur during the first stage of the mosquito season, which begins in July. However, the mosquitoes would not be able to take up the infecting organism until they bite diseased rodents. The earliest they can do this is during the the first part of the summer. Moreover, it must

also take a part of the early summer for the infection to become spread among the rodents. Thus the mosquitoes would not have much opportunity to take up the infecting agent until the middle of summer.

After the disease begins to occur in humans, it is not improbable that it may be spread, at least partly, by mosquitoes which have sucked blood from human patients during the initial, septicemic stage. This is also indicated by the fact that the cases often accumulate in foci. However, nothing definite can be said about this point as yet.

Further support for the mosquito theory is given by the experimental investigations published by *Philip, Davis and Parker*²¹⁾ in 1932. Their study was prompted by four cases in which the epidemiologic observations pointed to infection by mosquitoes. In 1941 *Thjölta*²³⁾ also published a case of probable mosquito infection in Norway. Not being aware of the American publication or of the many Swedish ones, he reported it as the first of its kind.

The experiments of *Philip, Davis and Parker* cover several species of mosquitoes, namely, *Aedes vexans*, *A. stimulans*, *A. nearcticus*, *A. canadensis*, *A. aegypti* and *Theobaldia incidens*. They attempted to show that mosquitoes could take up *Bacterium tularensis* by sucking the blood of infected guinea pigs. They succeeded in several experiments, but not regularly. With all the species named, the bacteria could still be demonstrated in some cases three to thirty-five days after the blood sucking. This was proved by crushing the mosquitoes and inoculating them into guinea pigs. On the other hand, they did not succeed in effecting transmission by having the insects bite infected guinea pigs and then bite healthy animals four to fifteen days later. In one series of experiments, mosquitoes were interrupted while they were sucking the blood of infected guinea pigs and immediately transferred to healthy animals where they continued the sucking. The infection was transmitted to the healthy animal in one of the eight experiments. In another series, mosquitoes infected by sucking were squashed against the shaved but otherwise uninjured skin of healthy guinea pigs. The disease was transferred to the healthy animal in 2 out of the 16 experiments with *A. aegypti*. To determine whether the infection could be transmitted from generation to generation in the mosquito, as in the case of certain ticks, eggs from infected *A. aegypti* were tested for

bacteria. The injection of these eggs into guinea pigs gave negative results, however. It was likewise tested whether the infection could be transmitted through the feces of infected mosquitoes. The feces were rubbed into the shaved skin of guinea pigs. In 3 out of 16 experiments, the disease was transmitted. The excrements had been taken 1, 3 and 4 days, respectively, after the day on which the mosquitoes were infected. The degree to which male mosquitoes could contribute to spreading the disease was tested by arranging copulation with females infected four to seven days earlier. In one of the four experiments, the male became infected.

These experiments give further support to the theory that mosquitoes help to spread the disease. Since it is generally possible to learn where the infection enters the body from the site of the primary lesion, it is interesting to see to what degree the position of the portal of entry is compatible with the mosquito hypothesis. For this, I chose the cases of tularemia occurring in the Gävleborg county and in Lappland during the years 1934 to 1940, and only look the patients who were not in direct contact with rodents. It is important to study the sex distribution in the cases, for the difference in clothing means a difference in exposure to insect bites.

First let us glance at the frequency of the different clinical forms in the selected series (table 2). The ulceroglandular type dominates, at least in the Gävleborg epidemics. The next in order is the glandular type which is almost as frequent as the first mentioned form in the Lappland epidemic. It is interesting to note that in not less than 17 of the 19 gland-

Table 2.
Clinical types.

	Ulceroglandular			Glandular			Typhoid			Total		
	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total
Gävleborg	132	197	329	13	7	20	5	4	9	150	208	358
Lappland	16	8	24	14	5	19*)	—	—	—	30	13	43
	148	205	353	27	12	39	5	4	9	180	221	401

*) 17 of these were situated on the face or neck.

ular cases in Lappland, the lesions were situated on the face or neck. The typhoid type is infrequent, amounting to only about 2 per cent of all the cases. The oculoglandular form is still rarer, only one case having been observed (not included in the table). As regards sex incidence, the women dominate among the cases in the Gävleborg county and the men in Lappland.

The ulceroglandular type is the best for elucidating the manner of infection, because of the exact information the primary lesion gives regarding the portal of entry of the infection. In table 3 the cases of this type are grouped accord-

Table 3.
Cases during the years 1935 to 1940.

	Primary lesion on											
	lower extremities			upper extremities			face or neck			Total		
	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total
Gävleborg	45	148	193	33	28	61	45	9	54	123	185	308
Lappland	—	3	3	3	2	5	13	3	16	16	8	24
	45	151	196	36	30	66	58	12	70	139	193	332

ing to the site of the primary lesion. In the Gävleborg cases, the ulcer is most often found on the lower extremities and the women completely dominate this group. In fact, the preponderance of women spoken of in connection with table 2 is entirely due to the uneven sex incidence in this group. Cases with lesions on the upper extremities occur with about the same frequency in both sexes. Localization on the face or neck is more common in men.

To what degree does the uneven sex distribution in these groups accord with the mosquito hypothesis? In the Gävleborg county it is extremely common for the women to go barelegged in the summer, and they are thus more exposed to mosquito bites than men. The high figure for women with lesions on the lower extremities is thus easy to explain. On

the other hand, the upper extremities are about equally accessible to mosquitoes in both sexes. Nor should the clothing of the two sexes make any difference to the frequency of mosquito bites on the neck and face. The preponderance of men in this group can be explained by the fact that they do more work out of doors and are thus more apt to encounter infected mosquitoes than women.

If we then look at the grouping in the Lappland cases, we see that lesions on the lower extremities were uncommon; only 3 cases, all of women, belong to this group. The reason for the low frequency is probably that the women in this part of the country do not dare to go barelegged so much in the summer as the women in the Gävleborg county. There are so many mosquitoes in Lappland that one cannot leave so much skin exposed, at least out of doors. This makes the lack of preponderance for women quite natural. Regarding the two other groups, the sex distribution is about the same as in the Gävleborg district. The preponderance of men, therefore, agrees with the mosquito hypothesis for the reason just given. Finally, the relatively great number of cases in the Lappland series with the primary lesion on the face or neck is worthy of mention. Even the glandular cases, as previously mentioned, had mostly this localization. These skin areas are the most difficult of all to protect, and are therefore the ones most exposed to mosquitoes in the places infested by them.

It is also interesting to study the age distribution in the cases. Figure 3 gives this in the form of a diagram covering the cases of tularemia in the Gävleborg county in the years 1934 and 1937 to 1940 and in Lappland in the years 1938 and 1939. The morbidity is calculated from the population figures for the different age groups on Dec. 31, 1935 for the Gävleborg and Norrbotten counties. In the first county the frequency for men is remarkably constant for all the age classes. The women agree well with the men in the youngest and oldest age group. The clothing in these ages should not make any difference as regards exposure to mosquitoes. In

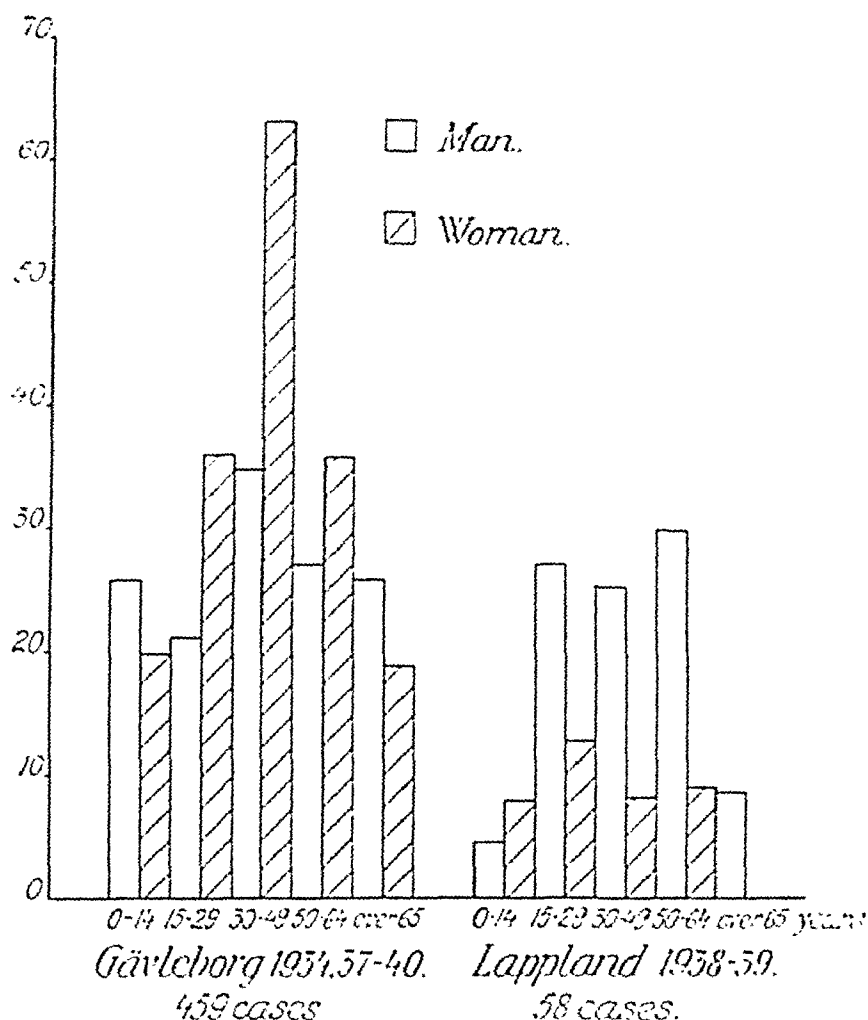


Fig. 3.

The age distribution in both sexes.

the working ages, on the other hand, the morbidity is much greater among the women than the men, especially in the group 30 to 49 years. As mentioned, this is probably due to the fact that the women are particularly exposed to mosquito bites because of their bare legs. In the Lappland material, the distribution is different. The men dominate over the wo-

men in all except the youngest age group, and the morbidity is specially high in the working age groups. This distribution, too, agrees well with what has been said about the possibilities of infection in the two sexes in this part of the country.

All these epidemiologic observations supporting the mosquito hypothesis, it seemed to be most important to have it confirmed by the demonstration of the infecting organism in these insects under natural conditions. Attempts were made to do this during the epidemic of 1937, but the mosquitoes in the region had already decreased considerably at the time of the investigation. Only a few insects could be examined and the experiments were negative. A better opportunity was presented in 1938, when a large number of cases of tularemia occurred in Forsbacka, a middle-sized iron-manufacturing community in the Gävleborg county. During the epidemic, which eventually included 55 cases, about fifty local mosquitoes of a like appearance were captured one late August night. Two examples were sent to Dr. *Edwards* in London who determined them to be *Aedes cinereus*. The other mosquitoes were crushed in a mortar, suspended in physiologic saline and inoculated subcutaneously into two guinea pigs. Seven days later, one of the animals died and the other, which was distinctly ill, was killed. Autopsy revealed changes typical of tularemia in both animals and *B. tularense* was isolated from the blood. This tularense strain tallied completely, as regards morphology, culture and serology, with the strains isolated from human cases in our country. This gave conclusive proof that tularemia occurs in mosquitoes. The manner of transmission indicated by the epidemiologic observations can thus be accepted as proved.

During the studies in Lappland, attempts were also made to demonstrate the infection in mosquitoes and other insects. The mosquito season had almost come to an end when the investigations were begun and the epidemic among the population had already ended. Only indoors could a few mosquitoes be caught. Inoculation into guinea pigs gave negative results. There were still gnats (*Culicoides fascipennis*) but

not any great amount. Inoculation with them also proved negative.

As mentioned, direct infection through contact with diseased rodents is the method of transmission which dominates completely in U. S. A. In Sweden insect infection, particularly by mosquitoes, dominates instead. There is also another distinct difference between these two countries in regard to this disease, namely, in regard to the lethality. The Americans reckon with a death rate of 4 to 5 per cent (*Cumming*,¹) *Foshay*,³) *Francis*⁴), but in our country not one death has occurred among the 582 cases recognized hitherto. The question is whether this difference in lethality is not connected with the difference in the mode of transmission. It is not inconceivable that the virulence of the bacteria is weakened during their existence in the mosquito. The Swedish cases of direct infection from rodents seem to be more severe than the other cases.

These investigations have considerably widened our knowledge of the occurrence and manner of transmission of tularemia. However, it has not shown us any definite means of fighting the disease. To eliminate the source of infection, the epizootics in the rodents, seems to be an infeasible task as yet; it is probably still more difficult to eradicate the great horder of mosquitoes which help to spread the disease.

IV. Serobacteriologic diagnosis.

A good deal of experience has been gained in the Swedish epidemics regarding the serobacteriologic diagnosis of tularemia in man, for practically all the diagnosis was concentrated to our laboratory. Serologic examination by the agglutination test was used as the standard method.

A bacillary suspension conserved by the addition of carbolic acid (0.5 per cent) was used as antigen. The testing was done with dilutions of serum 1:40, 1:80, 1:160, etc. to 1:5120 and the reaction determined after incubation for twenty hours at 37° C.

Table 4.
1937 to 1940.

No. of days after disease onset	0 aggl. 1/40	Agglutination in serum diluted								No. of neg. aggl.	No. of pos. aggl.	Total
		1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120			
4	1									1		1
5	2									2		2
6	3			1						3	1	4
7	2									2		2
8	5	1	1							5	2	7
9	4	1		1	1					4	3	7
10	6	1	2							6	3	9
11	8	2	1		1					8 (23)	4 (9)	12 (32)
12	7	2	2	2	1		2			7	9	16
13	3	3	3	2	4	1				3	13	16
14	6		1	1	1	1	1			6	5	11
15	1		4	2		2				1 (24)	8 (31)	9 (55)
16	1	1	6	1		2	1		1	1	12	13
17	2		1	3	2		1			2	7	9
18	1	1		3	4	4	1	1		1	14	15
19		2	1	2	7	6	2	1			21	21
20			3	6	5	5			1		20	20
21				1	3	1		1			6	6
22	1	1		2	3	1		1		1 (5)	8 (88)	9 (93)
23			1	2	3		1				7	7
24			1	3	2	2	1				9	9
25				1	2	2					5	5
26			3	1	3		1	1			9	9
27					2	1		1			4	4
28				2	2	1	1				6	6
29						3					3	3
30		2	1	3	1						7	7
Total	53	17	31	39	47	32	12	6	2	53	186	239

The results of 239 tests, done during 1937 to 1940 are seen in table 4. Only the cases in which the exact day the disease set in is known are included. We thus obtain a good idea of the relation to the different stages of the disease. As a rule, the agglutination was not positive until the eleventh to fourteenth day of illness. Of 55 tests done at this stage, 31 gave positive results. Positive reactions during the first ten days of the disease were infrequent, occurring in only 9 of the 32 specimens examined. However, in one case the reaction was distinctly positive on the sixth day. On the other hand, specimens taken as late as the third week occasionally gave negative results, in 5 out of 93 specimens in my material. In one case the reaction was negative on the twenty-second day of illness.

Thus agglutination occurs relatively late in tularemia; in suspected cases, therefore, one should continue the testing until three weeks after the onset of the disease. Moreover, the agglutinin titer often remains at a low level; three specimens still showed agglutination only in the 1:40 or 1:80 dilutions thirty days after the onset.

During later years a number of attempts were also made to use *Henninger's*^{7,8)} »Schnellprobe« for the serologic diagnosis of tularemia, a method previously mentioned by *Olin* and *Malmgren*.¹⁰⁾ The method has also been tested by *Lundmark*.¹²⁾

The following technic was used. A drop of blood from the finger tip is placed on a slide and to it is immediately added a drop of a thick suspension of killed *B. tularensis*. A positive reaction is indicated by distinct agglutination of the added bacteria within the space of one minute.

The method was tested in 15 cases parallelly with the ordinary agglutination reaction. Table 5 gives the results. There is complete compatibility except for one case in which the direct test gave a positive reaction, but the ordinary agglutination test a negative one on the seventh day of illness. Thus the direct test seems to constitute a valuable complement to the diagnostic methods.

Table 5.

Disease day	Aggl. titer	Direct test
7	0	pos.
13	0	neg.
14	$1/160$	pos.
15	$1/610$	pos.
17	$1/40$	pos.
17	$1/160$	pos.
17	$1/610$	pos.
19	$1/610$	pos.
20	$1/40$	pos.
33	$1/320$	pos.
36	$1/320$	pos.
46	$1/320$	pos.
50	$1/80$	pos.
51	$1/160$	pos.
51	$1/160$	pos.

Another method of diagnosing the disease, to demonstrate the disease agent itself, is also of great practical and theoretical importance. We have assembled a great deal of material in this way during the course of the years.

Material for examination has been taken from the primary lesion and from pus from suppurating lymph nodes. In the first case the lesion is scraped off with a suitable instrument and the obtained material sent to the laboratory suspended in a small amount of physiologic saline. In the latter case, a liquefying gland is punctured, and the material obtained sent in a sterile glass tube. Both types of material are tested by subcutaneous inoculation into guinea pigs. In the case of a positive reaction, the animals usually die within four to ten days, their internal organs then exhibiting the changes characteristic of tularemia. The bacteria are easily isolated, if the animal is killed while in death agony and cultures made from the cardiac blood and spleen on blood-glucose-cystine agar slants. If the animals show no signs of disease, they are killed

three weeks later and the result marked as negative, unless any lesions are observed on autopsy.

Secretion from the primary lesion was examined in 41 cases, and not less than 34 gave positive results (table 6). *B. tularensis* is demonstrable in this way during the very first week of illness, and so the method makes early diagnosis possible. On one occasion the bacteria could still be demonstrated four weeks after the onset of the disease. Sporadic tests taken at a later stage, however, gave negative results.

Pus taken from swollen glands did not give the same yield; only 11 of 54 tests were positive; most of the positive specimens were taken between the thirteenth and twenty-fourth day of illness. One specimen gave positive results as late as the forty-eighth day. As a rule, however, the bacteria are not demonstrable after the twenty-fourth day of illness; except for the case just mentioned, all of a large number of specimens taken during later stages of the disease were negative.

Thus it is nearly always possible to make a bacteriologic diagnosis of tularemia by inoculating secretion from the primary lesion into guinea pigs. Pus from lymphadenitis, on the other hand, is not as good for diagnosis.

V. Direct transmission of the disease from person to person.

These results give us certain information on the degree to which patients with tularemia may be considered a source of infection to those around them. Contact with secreting primary lesion, at least during the first four weeks of the disease, would seem to involve a risk. Suppurating glands during the same period should also be a source of infection; as the disease progresses, however, there should be very little risk of infection from this source.

Theoretically, therefore, the possibility of dissemination from person to person is relatively large. In practice, however, this manner of dissemination seems to be of very little importance. Epidemiologic observations both in our country

Table 6.

No. of days after disease onset	Secretion from primary lesion		Pus from lymphadenitis	
	pos.	neg.	pos.	neg.
4	1			
5	2			
6	1	1		
7	2			
8	2			
9	1			
10	3			
11	1	2		
13	2		1	
14	3			1
15	3		2	
16	2		1	
17	2	1	1	1
18				1
19	2			
20	3		1	1
21			1	1
22	1			3
23	1		2	1
24			1	
25	1			1
26				3
27		1		2
28	1			2
29				2
31— 35				8
36— 40				5
41— 45		1		2
46— 50			1	5
51— 60		1		1
61— 70				1
71— 80				1
91—100				1
Total	34	7	11	43

and others have only occasionally cast suspicion on contact with diseased persons. There was one patient during the Gävleborg epidemic of 1938, however, who probably became infected by contact with another person. The first patient fell ill in September, that is, during the mosquito season. The glands in his face and neck became greatly swollen and later discharged copious amounts of pus. In the beginning of November another member of the same family fell ill, this time with the glandular form with adenitis in the right axilla. The localization of the adenitis points to the infectious agent having entered through the right hand, which in itself indicates infection by contact. The occurrence of the second case, long after the mosquito season, also points to this manner of infection.

Summary.

I. There have been nearly six hundred cases of tularemia in Sweden since 1931. Their geographic distribution is described.

II. Tularemia has been demonstrated in the hare (*Lepus timidus*). Epidemiologic observations indicate that the infection also occurs in the squirrel (*Sciurus vulgaris*), which experiments have proved to be susceptible, and the rat.

During the lemming year of 1938, the infection was demonstrated for the first time in the lemming (*Lemmus lemmus*). At the same time as the diseased animals were found, there was an epidemic among the human inhabitants of the region, totalling sixty cases. Five strains of *Bacterium tularense* isolated from lemmings showed complete correspondence with strains isolated from humans. The infection leads to death in the lemming.

Fleas (*Megabothris rectangulatus*) found on lemmings proved to be infected with *Bacterium tularense*.

III. The manner in which the disease is transmitted to

man was studied. Only 18 of 582 patients had been in direct contact with rodents. In the other cases, the infection was probably transmitted by insects. Epidemiologic facts pointed to the mosquito as the most common vector.

Upon examination of mosquitoes (*Aedes cinereus*) from a district visited by an epidemic, it was ascertained that *Bacterium tularensense* occurred in these insects under natural conditions.

IV. The serobacteriologic diagnosis was discussed. Specific agglutinins generally do not appear until the eleventh to fourteenth day of illness, in some cases not until the third week. Slide agglutination according to *Henninger* is a good quick method.

The bacteria are easily demonstrated in the secretion from the primary lesion by inoculating it on guinea pigs during the first month; 34 of 41 tests were positive. They can also be demonstrated in the pus from suppurating lymph glands, but not as easily; only 11 of 54 specimens, some taken during the later stages of the disease, were positive.

V. Direct transfer of the disease from person to person appears to be a rare occurrence, despite the fact that the excretion of the bacteria in secretion from the primary lesion and in pus makes it possible for the disease to spread in this manner.

BIBLIOGRAPHY.

1. *Cumming, H. S.*: Bull. mens. Off. int. Hyg. publ. 1937: 29: 2532.
2. *Dieter, L. V. & Rhodes, B.*: J. inf. Dis. 1926: 38: 54.
3. *Foshay, L.*: Medicine, 1940: 19: 1.
4. *Francis, E.*: J. A. M. A. 1928: 91: 1155.
5. *Granström, K. O.*: Svensk Läk. tidn. 1932: 28: 641.
6. — Acta Ophth. 1932: 10: 237.
7. *Henninger, H.*: Zbl. Bakt. I. Orig. 1937: 140: 105.
8. — Reichsgesundheitsbl. 1938: 13: 116 & 620.
9. *Horne, H.*: Zbl. Bakt. I. Orig. 1912: 66: 169.

10. *Lillie, R. D. & Francis, E.*: Nat. inst. of Health. Bull. 167, 1937, p. 147.
11. *Lillie, R. D. & Parker, R. R.*: Ibid. p. 179.
12. *Lundmark, F.*: Svensk Läk.tidn. 1939: 36: 655.
13. *Malmgren, B.*: Bull. mens. Off. int. Hyg. publ. 1935: 27: 2184.
14. *McCoy, G. V.*: Publ. Health. Bull. 1911: 43: 53.
15. *Olin, G.*: Bull. mens. Off. int. Hyg. publ. 1932: 24: 1265.
16. — Ibid. 1934: 26: 895.
17. — Ibid. 1938: 30: 2804.
18. — Hygiea, 1938: 100: 4: 236.
19. *Olin, G. & Malmgren, B.*: Nord. Med. Tidskr. 1935: 9: 486.
20. *Olin, G. & Schlstedt, P.*: Hygiea, 1932: 94: 705.
21. *Philip, C. B., Davis, G. E. & Parker, R. R.*: Publ. Health. Rep. 1932: 47: 2077.
22. *Thjötta, Th.*: J. inf. Dis. 1931: 49: 99.
23. — Nord. Med. 1941: 9: 285.

ÜBER POLYVALENTE IMMUNSEREN ZUR SALMONELLA-DIAGNOSE.

Von *F. Kauffmann*.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. November 1941).

Infolge der grossen Zahl von Salmonella-Antigenen ist ihre Feststellung in fraglichen Kulturen eine zeitraubende Untersuchung, selbst wenn man sich hierzu der Objektglas-Agglutination bedient, da man über 50 einzelne Immunseren anzuwenden hat. Um diese Prüfung zu vereinfachen, kann man Mischseren herstellen, d. h. verschiedene fertige Immunseren zu gleichen Teilen mischen, um hierdurch die Zahl der anzusetzenden Reaktionen zu vermindern. In dieser Weise geht man bekanntlich auch bei der Pneumokokken-Typendiagnose vor, da man zunächst mehrere Mischseren A, B, C, D u. s. w. anwendet und dann bei positivem Ausfalle in einem dieser Seren nur noch diejenigen einzelnen Seren zu prüfen braucht, die in dieser Mischung enthalten sind. Es ist einleuchtend, dass die Herstellung von Mischseren das Vorhandensein genügend starker Einzelseren voraussetzt, damit die durch das Mischen verdünnten Seren für die betreffende Reaktion brauchbar bleiben.

Auf Grund der Untersuchungen von *M. Bjørneboe* über »Serumprotein und Antistoffprotein bei Immunisierung mit mehreren Antigenen«, die ergaben, dass durch gleichzeitige Immunisierung von Kaninchen mit mehreren Pneumokokken-Typen hochwertige polyvalente Seren erzielt wurden, gingen wir dazu über, die notwen-

digen diagnostischen Seren polyvalent herzustellen, d. h. die Tiere gleichzeitig mit mehreren Pneumokokken-Typen zu immunisieren. Über diese Versuche, die zum Erfolge führten, wird später von E. Morch näher berichtet werden.

Gleichzeitig mit diesen Pneumokokken-Versuchen führte ich die Immunisierung von Kaninchen mit verschiedenen Salmonella-Typen aus, um zur Vereinfachung der Salmonella-Diagnose polyvalente O- und H-Seren zu erhalten.

Die Herstellung der polyvalenten O-Seren.

Es wurden 3 Gruppen mit je 6 Kulturen gebildet, wobei darauf geachtet wurde, dass zwischen diesen 3 Gruppen so geringe Antigenbeziehungen wie möglich bestanden, um übergreifende Reaktionen zu vermeiden. Deshalb wurden z. B. alle Typen mit XII-Antigen im OA-Serum und alle Typen mit VI-Antigen im OB-Serum zusammengefasst.

Die polyvalenten O-Seren wurden mit folgenden Kulturen hergestellt:

Das OA-Serum mit:	S. paratyphi A	= I.II.XII ...
	S. paratyphi B	= IV.V.XII ...
	S. enteritidis	= IX.XII ...
	S. london	= III.X.XXVI.
	S. senftenberg	= I.III.XIX.
	S. minnesota	= XXI.XXVI.
Das OB-Serum mit:	S. thompson	= VI ₁ .VI ₂ .VII ...
	S. newport	= VI ₁ .VIII ...
	S. aberdeen	= XI.
	S. poona	= XIII.XXII.
	S. carrau	= VI.XIV.XXIV.
	S. kentucky	= (VIII).XX.
Das OC-Serum mit:	S. hvtittingfoss	= XVI.
	S. kirkee	= XVII.
	S. cerro	= XVIII.
	S. tel-aviv	= XXVIII.
	S. ballerup	= XXIX.
	S. urbana	= XXX.

Das OM-Serum wurde durch Mischung von gleichen Teilen der Seren OA, OB und OC hergestellt.

Von den einzelnen Kulturen wurden Agarplatten angelegt, die nach 20std. Bebrütung bei 37° C. in 0,9 % NaCl-Lösung aufgeschwemmt wurden. Diese Aufschwemmungen waren 100 mal so dicht wie eine 20std. Bouillonkultur von *S. paratyphi* B und wurden 2½ Stunde lang im Dampftopf auf 100° C. erhitzt, worauf sie zur Konservierung mit 0,2 % Formalin (ausgehend von dem käuflichen 40 % Formalin) versetzt wurden. Den oben erwähnten 3 Gruppen entsprechend wurden dann je 6 Vaccinen zu gleichen Teilen mit einander gemischt, sodass also 3 verschiedene Mischvaccinen, OA, OB und OC genannt, entstanden. Diese wurden im Eisschrank von + 4° C. aufbewahrt und zur Immunisierung der Kaninchen benutzt. Die hierzu notwendigen Verdünnungen wurden in NaCl-Lösung hergestellt, und zwar derart, dass bei jeder folgenden Injektion steigende Mengen i. v. gegeben wurden. Die Kaninchen, je 30 pro Gruppe, enthielten pro Injektion 0,5 ccm Vaccine, die folgenden Mengen einer 20std. Bouillonkultur entsprach: 0,25 — 0,5 — 1,0 — 2,0 — 3,0 — 4,0 — 5,0 — 6,0 und 7,0 ccm. Im ganzen wurden 9 Injektionen gegeben, und zwar in Abständen von 4—5 Tagen. Während der Immunisierung starben von 90 Kaninchen nur 2 Tiere. 7—8 Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen entblutet, worauf das Serum von je 30 Kaninchen gemischt wurde. Zur Konservierung wurde 0,1 ‰ Merthiolat zugesetzt; die Aufbewahrung der Seren erfolgte im Eisschrank von + 4° C.

Die Prüfung dieser polyvalenten O-Seren erfolgte mit Hilfe der Objektglas-Agglutination von lebenden Agarkulturen und mit Hilfe der Reagenzglas-Agglutination von Alcohol-Suspensionen (siehe Tabelle 1 und 2).

Die Tabelle 1 zeigt, dass man bei einer Serumverdünnung von 1:5 mit den 3 Seren OA, OB und OC positive Reaktionen in den entsprechenden Gruppen erhält. In der Verdünnung von 1:10 sind die Seren OB und OC ebenfalls brauchbar, doch versagt das OA-Serum in dieser Verdünnung gegenüber *S. schleissheim*, die nicht zur Immunisierung mit benutzt wurde. In Zukunft soll man daher bei der Herstellung eines OA-Serum ausser den oben angegebenen Kulturen noch *S. schleissheim* anwenden, da man dann wahrscheinlich dieses Serum auch in der Verdünnung von 1:10 gebrauchen kann. Es ist nämlich erwünscht, die Seren so weit wie möglich zu verdünnen, da man hierdurch einen Teil der übergreifenden Reaktionen auf andere, nicht zur *Salmonella*-Gruppe gehörende

Tabelle 1.
Ergebnisse der Objektglas-Agglutination.

Kulturen	O-Immunseren								
	OA		OB		OC		OM		
	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10
S. paratyphi A	++	++	—	—	—	—	++	++	—
S. paratyphi B	++	+	±	—	±	—	++	++	+
S. essen 173	++	++	—	—	—	—	++	+	—
S. bredeney	++	++	—	—	—	—	++	++	±
S. schleissheim	+	—	—	—	—	—	+	—	—
S. typhi H 901	++	++	±	—	±	—	++	++	+
S. enteritidis	++	+	—	—	—	—	++	++	—
S. london	++	++	—	—	—	—	++	++	+
S. newington	++	+	±	—	±	—	++	+	—
S. senftenberg	++	++	±	—	—	—	++	++	+
S. minnesota	++	+	—	—	—	—	++	++	—
S. cholerae suis	—	—	++	++	—	—	++	++	±
S. thompson	—	—	++	+	—	—	++	++	—
S. newport	—	—	++	++	—	—	++	++	—
S. aberdeen	±	—	++	++	±	—	++	++	±
S. poona	±	—	++	+	±	—	++	++	±
S. worthington	+	—	++	+	±	—	++	++	±
S. carrau	±	—	++	++	±	±	++	++	±
S. onderstepoort	+	—	++	++	+	—	++	++	±
S. kentucky	—	—	++	++	+	—	++	++	±
S. hvtittingfoss	—	—	±	—	++	++	++	++	—
S. kirkee	—	—	—	—	++	++	++	++	—
S. cerro	—	—	—	—	++	++	++	++	—
S. tel-aviv	±	—	+	±	++	++	++	++	+
S. ballerup	±	—	±	—	++	++	++	++	±
S. urbana	—	—	—	—	++	++	++	++	—

Zeichenerklärung:

++, +, ± = verschiedene Stärke der Objektglas-Agglutination;

± = nur mit der Lupe (8 fach) erkennbar; — = negativ.

1:2, 1:5, 1:10 = Serumverdünnungen.

Tabelle 2.
Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination.

Kulturen	O-Immunseren			
	OA	OB	OC	OM
<i>S. paratyphi</i> A	320++	0	0	160++
<i>S. paratyphi</i> B	320++	0	0	160++
<i>S. essen</i> 173	320++	20+	0	160++
<i>S. bredeney</i>	320++	40+	0	160++
<i>S. schleissheim</i>	320++	40+	0	160++
<i>S. typhi</i> H 901	640++	80+	40+	320++
<i>S. enteritidis</i>	320++	0	0	160++
<i>S. london</i>	640++	20+	0	320++
<i>S. newington</i>	160++	20+	20+	80++
<i>S. senftenberg</i>	640++	40+	0	320++
<i>S. minnesota</i>	640++	0	0	160++
<i>S. cholerae</i> suis	0	320++	0	80++
<i>S. thompson</i>	0	320++	0	160++
<i>S. newport</i>	40+	320++	0	160++
<i>S. aberdeen</i>	0	320++	0	160++
<i>S. poona</i>	0	160++	0	80++
<i>S. worthington</i>	80++	160++	20+	80++
<i>S. carrau</i>	0	640++	0	320++
<i>S. onderstepoort</i>	80++	160++	20+	160++
<i>S. kentucky</i>	0	160++	0	80++
<i>S. hvitvingfoss</i>	0	0	320++	160++
<i>S. kirkee</i>	0	0	640++	320++
<i>S. cerro</i>	0	40+	640++	160++
<i>S. tel-aviv</i>	0	40+	320++	160++
<i>S. ballerup</i>	20+	20+	160++	80++
<i>S. urbana</i>	0	40+	320++	160++

Zeichenerklärung:

++ = starke O-Agglutination, + = schwache O-Agglutination.
0 = negativ bei 1:20 oder sehr schwache nur mit der Lupe erkennbare O-Agglutination.

Die Zahlen geben die Agglutinationstiter an, die den mit blossem Auge ablesbaren Reaktionen entsprechen. Die mit der Lupe erkennbare Agglutination liegt gewöhnlich noch eine Stufe höher; also z. B. 320++ 640±.

Kulturen vermeidet. Ich habe verschiedene Kulturen mit diesen polyvalenten Seren geprüft und vor allem positive Reaktionen mit Flexner A- und D-Kulturen festgestellt. Alle 4 Seren (OA, OB, OC und OM) ergaben in der Verdünnung von 1:5 mit diesen Stämmen eine positive Objektglas-Agglutination. Titrierte man diese Seren in der Reagenzglas-Agglutination aus, so lagen die Titer zwischen 1:20—1:80. Flexner H-Kulturen, die in der Objektglas-Agglutination negativ reagierten, ergaben im Reagenzglase eine sehr schwache Agglutination.

Es ist selbstverständlich, dass alle Kulturen, die *Salmonella* O-Antigene enthielten, von den entsprechenden polyvalenten O-Seren agglutiniert wurden, so z. B. *S. coli* 3 vom OA-Serum. Andere Coli-Kulturen, die derartige Antigenbeziehungen nicht aufwiesen, wurden zum grössten Teile von keinem der polyvalenten Seren agglutiniert; doch kamen einige Kulturen vor, die vom OM-Serum in der Verdünnung von 1:2 geflockt wurden. Es ist daher ratsam, dieses Serum in der Verdünnung von 1:5 anzuwenden, die übrigen 3 Seren dagegen in der Verdünnung von 1:10. Um eine *S. schleissheim*-Kultur hierbei nicht zu übersehen, ist man genötigt, gleichzeitig ein IV-Serum anzuwenden, jedenfalls solange, bis man über ein vollwertigeres OA-Serum verfügt. Zur Erfassung von O-inagglutinablen Typhus-Kulturen muss man ausserdem noch ein Vi-Serum benutzen. Mit Hilfe dieser Seren kann man sämtliche *Salmonella*-Kulturen erfassen, muss jedoch darüber im Klaren sein, dass eine positive Agglutination allein nicht das Vorliegen eines *Salmonella*-Stammes beweist. Man muss daher in solchen Fällen stets eine genauere serologische und kulturelle Untersuchung anschliessen. Im praktischen Betriebe eines Untersuchungsamtes wird es zweifellos eine Zeit- und Arbeitersparnis bedeuten, wenn man auf Grund einer negativen Objektglas-Agglutination im OM-Serum das Vorliegen bekannter *Salmonella*-Typen ausschliessen kann. Kommt es dagegen hierin zur Agglutination, so wendet man die 3 Seren (OA, OB und OC) getrennt an, um zu sehen, zu

welcher dieser 3 Gruppen der betreffende Stamm gehört. Agglutiniert er dann z. B. im OC-Serum, so braucht man nur die 6 Seren einzeln anzuwenden, die hier in Frage kommen: *S. hvittingfoss*, *S. kirkee*, *S. cerro*, *S. tel-aviv*, *S. ballerup* und *S. urbana*.

Um hiervon ein Beispiel zu geben, sei die O-Antigenbestimmung von *S. hvittingfoss* im folgenden schematisch wiedergegeben:

Objektglas-Agglutination.

1) OM-Serum	=	+
2) OA-Serum	=	—
OB- »	=	—
OC- »	=	+
3) XVI- Serum	=	+
XVII- »	=	—
XVIII- »	=	—
XXVIII- »	=	—
XXIX- »	=	—
XXX- »	=	—

Resultat: Es liegt ein Stamm vor, der vom XVI-Serum agglutiniert wird. Die weitere Antigenanalyse erfolgt mit verschiedenen H-Seren, denen wir uns jetzt zuwenden wollen.

Die Herstellung der polyvalenten H-Seren.

Es wurden 4 polyvalente H-Seren hergestellt, und zwar mit folgenden Kulturen:

Das HA-Serum mit: <i>S. paratyphi</i> A	= a
<i>S. schleissheim</i>	= b, z ₁₂
<i>S. cholerae suis</i> spez.	= c
<i>S. typhi</i>	= d
<i>S. typhi murium</i> spez.	= i
<i>S. glostrup</i> α	= z ₁₀
<i>S. ballerup</i>	= z ₁₄

Das <i>HB-Serum</i> mit:	<i>S. eastbourne</i> spez.	= e,h
	<i>S. abortus equi</i> β	= e,n,x
	<i>S. hvittingfoss</i> β	= e,n,x
	<i>S. derby</i>	= f,g
	<i>S. enteritidis</i>	= g,m
	<i>S. montevideo</i>	= g,m,s
	<i>S. dublin</i>	= g,p
	<i>S. senftenberg</i>	= g,s,t
	<i>S. moscow</i>	= g,q
	<i>S. oranienburg</i>	= m,t
Das <i>HC-Serum</i> mit:	<i>S. thompson</i> spez.	= k
	<i>S. london</i> spez.	= l,v
	<i>S. dar es salaam</i> α	= l,w
	<i>S. virchow</i> spez.	= r
	<i>S. bareilly</i> spez.	= y
	<i>S. poona</i> spez.	= z...
	<i>S. cerro</i>	= z_4, z_{23}, z_{25}
	<i>S. duesseldorf</i>	= z_4, z_{24}
Das <i>HD-Serum</i> mit:	<i>S. paratyphi</i> B unspesz.	= 1,2...
	<i>S. newport</i> »	= 1,2,3...
	<i>S. thompson</i> »	= 1,5...
	<i>S. anatum</i> »	= 1,6...
	<i>S. bredeney</i> »	= 1,7...
	<i>S. kentucky</i> β	= z_6

Obwohl für die praktische Diagnose ein unspezifisches H-Serum, das z. B. nur mit der unspezifischen Phase von *S. newport* hergestellt ist, genügt, wurden hier alle bekannten unspezifischen Phasen gemischt, um Antikörper gegen alle hierin vorkommenden Antigene zu erhalten.

Das *HM-Serum* wurde durch Mischung von gleichen Teilen der Seren HA, HB, HC und HD hergestellt.

Die zur Herstellung der H-Seren benutzten Vaccinen wurden alle von Schwärmagarplatten nach *Gard* bereitet, und zwar die monophasischen Kulturen ohne Serumzusatz, die diphasischen dagegen mit verschiedenen Serumzusätzen (1:100), die in der folgenden Liste verzeichnet sind. Diese Seren sollten keine O- und H-Agglutinine gegen diejenige Phase enthalten, die man auf den Platten zum Schwärmen bringen wollte, sie mussten dagegen diejenigen H-Agglutinine besitzen, die das Schwärmen der unerwünschten Phasen verhinderten.

<i>Schwärmkultur</i>	<i>II-Serum</i>
<i>S. cholerae suis</i> spez.	+ <i>S. kaposvar</i> unspez.
<i>S. typhi murium</i> spez.	+ <i>S. newport</i> unspez.
<i>S. glostrup</i> α	+ <i>S. san diego</i> β
<i>S. eastbourne</i> spez.	+ <i>S. thompson</i> unspez.
<i>S. hvittingfoss</i> β	+ <i>S. schleissheim</i>
<i>S. thompson</i> spez.	+ <i>kaposvar</i> unspez.
<i>S. london</i> spez.	+ <i>S. poona</i> unspez.
<i>S. dar es salaam</i> α	+ <i>S. san diego</i> β
<i>S. virchow</i> spez.	+ <i>S. saint-paul</i> unspez.
<i>S. bareilly</i> spez.	+ <i>S. kaposvar</i> unspez.
<i>S. poona</i> spez.	+ <i>S. anatum</i> unspez.
<i>S. paratyphi B</i> unspez.	+ <i>S. minnesota</i> α
<i>S. anatum</i> unspez.	+ <i>S. san diego</i> α
<i>S. bredeney</i> unspez.	+ <i>S. goettingen</i> α
<i>S. kentucky</i> β	+ <i>S. aberdeen</i> spez.

Betreffs der Antigenformeln sei auf das *Kauffmann-White-Schema* 1940 in meinen Buche »Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe« verwiesen.

Die Schwärmkulturen wurden nach 20std. Bebrütung bei 37° C. mit 1 % Formalin-NaCl-Lösung abgeschwemmt, sodass eine sehr dichte Aufschwemmung entstand, die 20 Stunden bei 37° C. und dann im Eisschrank aufbewahrt wurde. In der Reagenzglas-Agglutination wurde diese Aufschwemmung (nach entsprechender Verdünnung) auf ihre Phasen-Reinheit geprüft, indem sie mit den entsprechenden Seren austitriert wurde. Auf Grund längerer Erfahrungen muss betont werden, dass sich die Schwärmkultur nach *Gard* ausgezeichnet bewährt hat, da sie die Herstellung grosser Antigenmengen der gewünschten Phase schnell und sicher gestattet und zu Seren von hoher Phasenreinheit führt. So stellte ich z.B. mit einer Schwärmkultur von *S. paratyphi B* spez. ein II-Serum her, das einen spezifischen II-Titer (b) von 1:25000 und einen unspezifischen II-Titer (1,2...) von 1:100 hatte. Ein spezifisches II-Serum von *S. typhi murium* (Schwärmkultur) hatte einen spezifischen II-Titer von 1:50000 und einen unspezifischen II-Titer von 1:20.

Den oben erwähnten 4 Gruppen von II-Antigenen entsprechend wurden die einzelnen Vaccinen zu gleichen Teilen mit einander gemischt, sodass 4 verschiedene Mischvaccinen, IIA, IIB, IIC und IID genannt, entstanden. Die Kaninchen, je 25 pro Gruppe, enthielten pro Injektion 0.5 ccm Vaccine, die folgenden Mengen einer 20std. Bouillonkultur entsprach: 0.25—0.5—1.0—2.0—3.0—4.0—5.0 und 6.0 ccm. Im ganzen wurden 8 Injektionen gegeben, und zwar in

Tabelle 3.
Ergebnisse der Objektglas-Agglutination.

Kulturen	H-Immunsereen				
	HA	HB	HC	HD	HM
	1:100	1:100	1:100	1:100	1:25
S. paratyphi A	XX	—	—	—	XX
S. paratyphi B spez.	XX	—	—	—	XX
S. schleissheim	XX	—	—	—	XX
S. cholerae suis spez.	XX	—	—	—	XX
S. typhi	XX	—	—	—	XX
S. typhi murium spez.	XX	—	—	—	XX
S. glostrup α	XX	—	—	—	XX
S. ballerup	XX	—	—	—	XX
S. eastbourne spez.	—	XX	—	—	XX
S. abortus equi β	—	XX	—	—	XX
S. hvittingfoss β	—	XX	—	—	XX
S. derby	—	XX	—	—	XX
S. enteritidis	—	XX	—	—	XX
S. montevideo	—	XX	—	—	XX
S. dublin	—	XX	—	—	XX
S. senftenberg	—	XX	—	—	XX
S. moscow	—	XX	—	—	XX
S. oranienburg	—	XX	—	—	XX
S. thompson spez.	—	—	XX	—	XX
S. london spez.	—	—	XX	X	XX
S. dar es salaam α	—	—	XX	X	XX
S. virchow spez.	—	—	XX	—	XX
S. bareilly spez.	—	—	XX	—	XX
S. poona spez.	—	—	XX	—	XX
S. cerro	—	—	XX	—	XX
S. duesseldorf	—	—	XX	—	XX
S. paratyphi B unspez.	—	—	—	XX	XX
S. newport unspez.	—	—	—	XX	XX
S. thompson unspez.	—	—	—	XX	XX
S. anatum unspez.	—	—	—	XX	XX
S. bredeney unspez.	—	—	—	XX	XX
S. kentucky β	—	—	—	XX	XX

Zeichenerklärung:

XX = starke H-Agglutination, X = schwache H-Agglutination,
— = keine H-Agglutination.

Tabelle 4.
Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination.

Kulturen	H-Immunseren				
	HA	HB	HC	HD	HM
<i>S. paratyphi</i> A	3200	0	50	50	800
<i>S. paratyphi</i> B spez.	3200	100	0	400	800
<i>S. schleissheim</i>	3200	0	0	0	800
<i>S. cholerae</i> suis spez.	6400	100	50	0	1600
<i>S. typhi</i>	3200	0	0	0	800
<i>S. typhi</i> murium spez.	6400	0	100	0	1600
<i>S. glostrup</i> α	6400	0	50	0	1600
<i>S. hallerup</i>	3200	0	0	0	800
<i>S. eastbourne</i> spez.	0	6400	0	50	1600
<i>S. abortus equi</i> β	0	6400	200	100	1600
<i>S. hvittingfoss</i> β	0	6400	100	50	1600
<i>S. derby</i>	0	3200	0	0	800
<i>S. enteritidis</i>	0	25600	0	0	6400
<i>S. montevideo</i>	0	12800	0	0	3200
<i>S. dublin</i>	0	12800	0	0	3200
<i>S. senftenberg</i>	0	12800	0	0	3200
<i>S. moscow</i>	0	12800	0	0	3200
<i>S. oranienburg</i>	0	12800	0	0	3200
<i>S. thompson</i> spez.	50	0	3200	200	800
<i>S. london</i> spez.	0	0	3200	800	800
<i>S. dar es salaam</i> α	0	0	3200	400	800
<i>S. virchow</i> spez.	100	0	3200	0	800
<i>S. bareilly</i> spez.	50	0	3200	50	800
<i>S. poona</i> spez.	0	0	3200	0	800
<i>S. cerro</i>	0	0	1600	0	400
<i>S. duesseldorf</i>	0	0	3200	0	800
<i>S. paratyphi</i> B unspez.	0	0	100	6400	1600
<i>S. newport</i> unspez.	0	0	200	12800	3200
<i>S. thompson</i> unspez.	0	0	200	12800	3200
<i>S. anatum</i> unspez.	0	0	200	12800	3200
<i>S. bredeney</i> unspez.	0	0	0	6400	1600
<i>S. kentucky</i> β	50	0	0	3200	800

Zeichenerklärung:

Die Zahlen geben die H-Agglutinations-Titer an.

0 = negativ bei 1:50.

Abständen von 4—5 Tagen. Unter der Immunisierung trat kein Tierverlust auf. 7—8 Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen entblutet, worauf das Serum von je 25 Kaninchen gemischt wurde. Zur Konservierung wurde 0,1 ‰ Merthiolat zugesetzt.

Die Prüfung der polyvalenten H-Seren HA, HB, HC und HD sowie des Mischserum HM, das gleiche Teile der soeben genannten 4 Seren enthielt, erfolgte in der Objektglas- und Reagenzglas-Agglutination. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 3 und 4 wiedergegeben. Man sieht aus Tabelle 3, dass die Seren HA, HB und HC völlig gruppenspezifisch reagieren, dass dagegen das HD-Serum auf *S. london* spez. und *S. dar es salaam* α übergreift. Dieser Fehler beruht auf der nicht völlig phasenreinen Kultur von *S. bredeney* unspez., die zur Immunisierung benutzt wurde, sodass man in Zukunft diese Kultur durch eine andere ersetzen soll. Durch Absorption mit einer spezifischen Kultur von *S. london* kann man diese Störung beseitigen. Das HM-Serum agglutiniert sämtliche Kulturen in starker Weise, sodass man also mit einem einzigen Serum alle bisher bekannten *Salmonella* H-Antigene erfassen kann. Die Reagenzglas-Agglutination (Tabelle 4) ergibt im wesentlichen dieselben Resultate wie die Objektglas-Agglutination, deckt aber verschiedene übergreifende Reaktionen auf, die unter Berücksichtigung der grossen Titerunterschiede bedeutungslos sind. Es kommt hinzu, dass im allgemeinen die Objektglas-Agglutination zur praktischen Typendiagnose genügt.

Um hiervon ein Beispiel zu geben, sei auf die oben erwähnte *S. hvittingfoss*-Diagnose zurückgekommen: Nachdem festgestellt wurde, dass der zu untersuchende Stamm vom XVI-Serum agglutiniert wurde, setzt man nun eine Objektglas-Agglutination im HM-Serum an, um zu sehen, ob der Stamm bekannte *Salmonella*-H-Antigene enthält. Fällt diese Reaktion positiv aus, so benutzt man die 4 polyvalenten Seren HA, HB, HC und HD. Ergibt dieser Versuch eine positive Agglutination der Massenkultur im HA- und im HB-Serum, so kann man vermuten, dass ein diphasischer Stamm mit α - β -Phasenwechsel vorliegt, weil im HB-Serum Antikörper ge-

gen die enx-Phase enthalten sind. Prüft man nun einzelne Kolonien in den beiden Seren HA und HB, so wird man sehen, dass einige Kolonien nur im HA-Serum, andere nur im HB-Serum reagieren. Bei weiterer Prüfung mit den entsprechenden Einzelseren wird man schnell feststellen können, dass hier die Antigene b resp. e, n, x . . . vorliegen, d. h. dass es sich hier um den Typus S. hvittingfoss (XVI. b \longleftrightarrow e, n, x . . .) handelt.

Besprechung der Ergebnisse.

Aus den vorliegenden Befunden geht hervor, dass es möglich ist, durch gleichzeitige Immunisierung von Kaninchen mit mehreren Salmonella-Typen polyvalente O- und H-Seren herzustellen. So wurden 3 O-Seren (OA, OB und OC) sowie 4 H-Seren (HA, HB, HC und HD) gewonnen, die in der Objektglas-Agglutination eine positive Reaktion mit den entsprechenden Salmonella-Antigenen ergaben. Durch Mischung der 3 O-Seren sowie der 4 H-Seren zu gleichen Teilen wurden 2 Mischseren (OM und HM) hergestellt, mit deren Hilfe alle Salmonella-Antigene erfasst wurden. Wie zu erwarten, reagierten besonders die O-Seren — auf Grund gemeinsamer Partialantigene — mit verschiedenen Kulturen, die nicht zur Salmonella-Gruppe gerechnet werden, z. B. mit Dysenterie Flexner A- und D-Kulturen. Zahlreiche Coli-Kulturen wurden von diesen Seren nicht oder nur unbedeutend geflockt. Die weitere praktische Erfahrung muss zeigen, wie gross der Nutzen dieser polyvalenten Seren resp. der beiden Mischseren, die den einzelnen Salmonella-Centralen zur Verfügung gestellt werden, ist.

Hervorgehoben sei noch die Tatsache, dass die Kaninchen die gleichzeitige Injektion zahlreicher Typen mit verschiedenen Antigenen sehr gut vertrugen (von 190 Tieren starben nur 2) und hochwertige Seren lieferten. Von einer sogenannten »Konkurrenz der Antigene« konnte in diesen Versuchen keine Rede sein. Ich glaube, dass man aus diesen Versuchen Rückschlüsse auf die aktive Immunisierung des Menschen ziehen und unbedenklich polyvalente Vaccinen anwenden kann.

Zusammenfassung.

Es wird über die Herstellung polyvalenter Salmonella O- und H-Seren durch gleichzeitige Immunisierung von Kaninchen mit mehreren Typen berichtet, durch die eine Vereinfachung der serologischen Salmonella-Diagnose möglich ist.

Durch Mischung von 3 polyvalenten O- resp. 4 polyvalenten H-Seren wurden 2 Mischseren gewonnen, mit denen man alle bekannten Salmonella- O- und H-Antigene in der Objektglas-Agglutination erfassen kann.

Die Kaninchen vertrugen die gleichzeitige Injektion mehrerer Typen ausgezeichnet und reagierten gegen alle benutzten Antigene in gleicher Weise, sodass von einer »Konkurrenz der Antigene« nichts zu merken war.

LITERATUR.

Bjorneboe, M.: Z. Immunf. 99, 245, 1941.

Gard, S.: Z. Hyg. 120, 615, 1938.

Kauffmann, F.: Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe. Verlag Einar Munksgaard, Kopenhagen, 1941.

ÜBER SOG. ENDOKARDMYXOME.

Von *Nils Ringertz*,

(Eingegangen bei der Redaktion am 25. November 1941).

Die geschwulstähnlichen Gebilde, welche als Myxoma endocardii (Fibromyxoma, Angio-elastomyxoma) bezeichnet werden, machen einen wesentlichen Teil der überhaupt seltenen primären Herztumoren aus. Diese Gebilde haben durch ihren eigenartigen Bau und ihren schwer zu deutenden Charakter das Interesse der Forscher in hohem Grade gefesselt, und zwischen etwa 1830 und 1940 sind weit mehr als hundert Veröffentlichungen über dieselben erschienen.

In bezug auf ihr Wesen stehen zwei Ansichten einander gegenüber, welche beide noch im neuesten Schrifttum vertreten werden. So stehen einige Forscher auf dem Standpunkt, es handle sich um echte Neoplasmen, während andere die Gebilde für eigenartig umgewandelte Thromben halten. Die Vertreter der Geschwulsttheorie scheinen sämtlich der Ansicht zu sein, dass die Geschwulst unter die Myxome einzureihen sei, und zwar deshalb, weil das Geschwulstgewebe eine reichliche hyaline Zwischensubstanz besitzt, welche in vielen Fällen die sog. Schleimreaktion mit Muzikarmin und Thionin gibt.

Mit der vorliegenden Arbeit wird in erster Linie bezweckt, über einen von mir obduzierten Fall von Myxom des linken Vorhofs zu berichten, wo der Tumor eine umfangreiche arterielle Emboliebildung veranlasst hatte. Es ergab sich bei

mikroskopischer Untersuchung, dass das Geschwulstgewebe in den Embolien Anzeichen selbständigen Wachstums aufwies, ein Verhalten, welches, soweit mir bekannt ist, bisher nicht beobachtet worden ist. Ein Ziel dieser Arbeit ist auch der Versuch, an Hand der Befunde bei diesem Fall, verglichen mit den erreichbaren Angaben über eine Reihe aus dem Schrifttum zusammengestellter Fälle, Wesen und Pathogenese dieser Geschwulstart zu ergründen.

Literaturübersicht.

Es ist sehr schwer, anzugeben, wie viele Fälle von Endokardmyxom veröffentlicht worden sind, denn bei einer grösseren Anzahl von Fällen, welche als Thrombengebilde beschrieben sind, lässt sich aus der Beschreibung nicht sicher entnehmen, ob ein derartiges sog. Myxom oder ein wirklicher Thrombus vorgelegen hat. *Husten* hat 1923 91 Fälle aus dem Schrifttum zusammengestellt, welche als Myxom oder Thrombus beschrieben worden waren. Diese Zusammenstellung enthält so früh wie in den ersten Jahrzehnten des 19. Jahrhunderts veröffentlichte Fälle (*Burns, Choisy*). *Husten* kommt nach einer kritischen Prüfung der gesammelten Fälle zu der Ansicht, dass nur 10 wahrscheinlich wirkliche Geschwülste waren. Aller Wahrscheinlichkeit nach sind jedoch eine weit grössere Anzahl Fälle in der Zusammenstellung von *Husten* Gebilde mit derjenigen Struktur, welche die sog. Myxome kennzeichnet, u. a. eine Menge Fälle, die unter der Bezeichnung »Thrombus« beschrieben worden waren. Da mir die Originalarbeiten in einem grossen Teil der *Hustenschen* Fälle nicht zur Verfügung standen, kann ich nur angeben, dass meiner Ansicht nach mindestens 36 und wahrscheinlich sogar etwa 50 dieser Fälle sog. Myxome gewesen sind.

Mandelstamm, welcher 1923 eine umfassende Literaturzusammenstellung über primäre Herztumoren veröffentlichte, führt eine Anzahl Fälle an, teilweise aus dem russischen Schrifttum, welche von *Husten* nicht berücksichtigt worden waren (*Petroff, Hlava, Brodowsky, Hirsch, Jaffé, Schor, Socin*).

Vom Jahre 1923 an habe ich im Schrifttum weitere 33 Fälle gefunden, welche ich für Endokardmyxome halte, sowie drei frühere, welche von *Husten* oder *Mandelstamm* nicht erwähnt werden (*Norton* 1919, *Ambrosius* 1919, *Weltman* 1920). Die betreffenden Fälle werden hier in Kürze referiert, und zwar aus Gründen der Übersichtlichkeit nach der Lokalisation geordnet.

Myxom des linken Vorhofs:

Norton: ♂, 29 J. Herzklopfen und Schwindelanfälle während 2 Wochen. Tumor gelappt, grauweiss-rotgesprenkelt, $9,5 \times 8,5$ cm. Mit breiter Basis auf dem Septum aufsitzend. Gehirn nicht obduziert.

Fabris: ♂, 48 J. Lungentuberkulose, keine Herzsymptome. Tumor traubenähnlich, grell hellrot, weich, gallertig, von der Grösse einer kleinen Pflaume. Sitzt mit einem kurzen, 3 mm dicken Stiel am Septum einige Millimeter oberhalb der Mitralklappenbasis auf. Sonst nichts Pathologisches am Herzen, keine Angaben über andere Organe.

Nowicki, Fall 2: ♀, 48 J. 8 Jahre Herzbeschwerden, Inkomensation. Tumor rund mit glatter Oberfläche, dunkel-graurot bis gelblich, gallertig, $5,5 \times 4,5$ cm. Durch kurzen, breiten Stiel mit der Vorderwand vor den Pulmonalvenen zusammenhängend, lateral vom Herzohr. Keine Anzeichen von Embolie.

Nowicki, Fall 3: ♀, 62 J. Ca. ventriculi + Peritonitis. Keine klinischen Herzerscheinungen. Tumor rund mit glatter Oberfläche, dunkel-graurot, gallertig, $4 \times 2,8$ cm. Durch kurzen, breiten Stiel mit dem Septum am hinteren unteren Teil der Plica semilunaris verbunden. Foramen ovale offen. Endokard des linken Vorhofs partiell verdickt.

Binder: ♀, 45 J. Herzinkompensation. Tumor papillär gelappt, gelbgrau-gelbweiss-rotgesprenkelt, gallertig, von der Grösse eines kleinen Eis. Stiel 2 mm lang, 1,5 mm dick, geht vom oberen Rande der Fossa ovalis aus; Septum an der Ansatzstelle trichterförmig ausgezogen. Alte Niereninfarkte ohne sichtbare Geschwulstembolien.

Schwarz: ♀, 15 J. Einige Monate Fieber, Ohnmachtsanfälle. Tumor traubenförmig mit drei Hauptklappen. Stiel 2,5 cm lang, 0,5 cm breit, hängt am Septum. Thrombenauflagerung am Stiel. Fibröse Endokarditis an den Mitralklappen und im linken Vorhof. Alte Infarkte in Nieren und Milz, Gehirn nicht untersucht.

Eimer: ♀, 37 J. Tumor kleinfingergross, gestielt, vom Septum ausgehend.

Guldberg: ♀, 76 J. Ein halbes Jahr lang Inkompen-

schwerden. Tumor kugelig, an der Oberfläche glatt. Hängt durch kurzen, 1,5 cm breiten Stiel mit der Fossa ovalis zusammen. Mikroskopisch »gefässreiches Fibrom, mit Blutungen durchsetzt«. Kar-dioarteriosklerose. Fibrosis myocardii.

Feller: Klinische Diagnose Tumor cerebri. Myxom des linken Vor-hofs. Embolie der linken A. fossae Sylvii. Ältere und frische Mala-zien in der linken Hemisphäre.

Windholz, Fall 1: ♂, 32 J. Klinische Diagnose Herzinsuffizienz, luetische Aortitis und Bronchopneumonie. Tumor rundlich, mit ziem-lich glatter Oberfläche, bernstein- bis ockergelb, gallertig, $4,2 \times 2,6 \times 3$ cm. Durch dünnen, kurzen Stiel mit dem Rand der Fossa ovalis verbunden.

Martin: ♀, 66 J. Seit 15 Jahren Symptome von Mitralstenose. Tumor papillär mit groben Einziehungen, kirschrot-gelbrot, galler-tig, $6,5 \times 2,4 \times 2,8$ cm. Hängt durch einen kurzen Stiel mit der Plica fossae ovalis zusammen.

Houck u. Bennet: ♀, 44 J. 6 Wochen Ohnmachtsanfälle, schliess-lich Inkompensation. Mors subita. Tumor polypoid, gelb, halbdurch-sichtig, $4,5 \times 4 \times 3$ cm. Fibröser Stiel, 5 mm im Durchmesser, am Septum 11 mm oberhalb der Mitralklappenbasis festsitzend, 8 mm darunter ein kleines offenes Foramen ovale. Nur Brustorgane ob-duziert.

Wassilieff, Fall 1: ♀, 43 J. Herzbeschwerden 7 Jahre, schliesslich Inkompensation. Tumor papillomatös, rosarot, geleeartig, mandari-nengross. Mit breiter Basis am Septum neben dem Limbus fossae ovalis aufsitzend. Fibröse Mitralendokarditis. Sonst Stauungsorgane und Hydrops.

Yater, Fall 6: ♀, 23 J. 2 Jahre lang Herzbeschwerden, schliesslich Inkompensation. Tumor rundlich, mit glatter Oberfläche, $6 \times 4,5 \times 3,5$ cm. Mit breiter Basis an der Fossa ovalis aufsitzend.

W. Müller, Fall 2: ♀, 63 J. 4 Wochen Inkompensationssymptome. Tumor rundlich, mit knolliger Oberfläche, grauweiss, fest-elastisch, gänseeigross. Mit breiter Basis an der Fossa ovalis aufsitzend. Chronische kalkulöse Mitralendokarditis mit Stenose.

Bacaloglu u. Gen.: ♀, 42 J. 1 Jahr Inkompensationserschei-nungen. Tumor eiförmig, mit glatter Oberfläche, rotgesprenkelt. Sitzt an der Fossa ovalis.

Ludwig: ♂, 34 J. $1\frac{1}{2}$ Jahre Herzbeschwerden. Symptome von Mitralstenose, periodenweise Fieber. Tumor polypös, rotgelb, 4 cm lang. Durch einen 5 mm dicken Stiel mit der Hinterwand des Vor-hofs 1 cm von der Fossa ovalis verbunden. Endokardfibrose neben der Ansatzstelle. Ein Niereninfarkt.

Gorlitzer: ♀, 50 J. Seit mehreren Jahren Anfälle von Bewusst-losigkeit. Plötzlicher Tod im epileptiformen Anfall. Tumor polypös,

rotgelb, glasig, in das Ostium mitrale hinabhängend. Mit schmalem Stiel am Septum festsitzend. In der A. cerebri anterior sin. ein 3 mm langer Geschwulstembolus, in beiden Aa. cerebri med. 1,5 cm lange und in der A. cerebri posterior sin. ein 2,5 cm langer Embolus. Embolien glasig, obturierend, ohne Sekundärthrombose. Frische Erweichungsherde noch nicht entwickelt, alte werden nicht erwähnt. Geschwulstemboli auch in einer Nierenarterie.

Masshof, Fall 1: ♀, 46 J. Hatte an Anämie gelitten. Herzbeschwerden nur 4 Monate, Inkompensation. Tumor traubenförmig, blassgelb-rotfleckig, gallertig, $7 \times 5 \times 3$ cm, Gewicht 54 g. Sitzt mit einem 1,5 cm langen Stiel an dem trichterförmig ausgezogenen Septum 2 cm oberhalb der Mitralklappenbasis, 1,5 cm vom Limbus foramin. ovalis auf. Sonst Stauungsorgane, Thrombose der V. femoralis mit Lungenembolie etc.

Masshof, Fall 2: ♀, 53 J. Während des letzten Jahres 4 »Schlaganfälle«. Nach dem letzten Gangrän beider Beine. Tumor eiförmig, gelappt, teilweise grauweiss, teilweise rot durch Thrombenauflagerung, weich, glasig, $3,2 \times 1,9 \times 1,5$ cm. 5pfennigstückgrosse Ansatzstelle am oberen Teil des Limbus foramin. ovalis. Emboli im unteren Teil der Aorta und in beiden Aa. iliacae, aus glasigen Geschwulstmassen mit Sekundärthrombose bestehend. Infarkte in Nieren und Milz (nicht mikroskopisch untersucht).

Bien u. Ch'in: ♂, 59 J. Ca. 3 Wochen Inkompensation und Symptome von Mitralstenose. Mors subita. Tumor eiförmig mit glatter Oberfläche, hellgelb, rotfleckig, gallertig, $5,5 \times 4,2$ cm. Mit breiter Basis am oberen medialen Teil der Vorderwand 2 cm vom Foramen ovale aufsitzend. Protrusion durch das Ostium mitrale.

Fossel, Fall 2: ♀, 52 J. 4 Jahre lang Herzbeschwerden. Inkompensation. Tumor hühnereigross, Oberfläche teils glatt, teils höckerig. Kleiner, vom Septum nahe am Foramen ovale ausgehender Stiel. Fibröse Mitralendokarditis.

Gilchrist u. Millar: ♂, 57 J. Anamnese $2\frac{1}{2}$ Monate mit präkordialen Schmerzattacken und zunehmender Inkompensation. Tumor teilweise gelappt, gelblich, gallertig. Gestielt, in der Mitte des Septums aufsitzend.

Laubry u. Gen.: ♂, 43 J. $11\frac{1}{2}$ Jahre Herzinkompensation. Tumor gelappt, hellgelb, 5×6 cm (70 g). Mit 5 mm langem Stiel unterhalb des Foramen ovale aufsitzend.

Riopelle: ♀, 53 J. 1 Jahr Herzinkompensation. Tumor eiförmig, mit leicht höckeriger Oberfläche, ambrafarben, rotgesprenkelt, gallertig, $5,4 \times 4$ cm. Mit breiter Basis am hinteren Teil des Septums aufsitzend. Der Autor glaubte, Anzeichen von Erythropoese im Tumor zu finden. Endokardverdickung im linken Vorhof.

Bennett u. Gen.: ♀, 37 J. $\frac{1}{2}$ Jahr asthmatische Beschwerden.

Röntgenbild als kongenitales Vitium cordis gedeutet. Exitus an Beckenabszess. Tumor unregelmässig-rundlich, glatt, gelbrot, etwas transparent, $3,5 \times 4$ cm. Gestielt, hängt am Septum neben dem Foramen ovale.

Kalbfleisch: ♀, 61 J. Ohne vorausgehende Krankheit Hemiplegie, Exitus nach ca. 24 Stunden. Tumor grob gelappt, rotgelb, schleimig, $2,5 \times 2 \times 1$ cm. Stiel 7 mm lang, einige Millimeter dick, sitzt 2 cm hinter dem Hinterrand des Foramen ovale und 2,5 cm von der Mitralklappenbasis auf. Geschwulstemboli in der linken A. carotis mit Sekundärthrombose. Akute Enzephalomalazie.

Myxom des rechten Vorhofs:

Ambrosius: ♂, 54 J. Tumor schleimig, ödematös $5 \times 4,7 \times 3,5$ cm, mit breiter Basis zwischen Mündung der V. cava inf. und Foramen ovale aufsitzend.

Weltmann: ♀, 20 J. Tumor grob gelappt, feinpapillär, dunkelrot, weich, schleimig, 10 cm lang. Durch einen schmalen fibrösen Stiel mit dem vorderen unteren Quadranten des Septums verbunden.

Czemes: Polypöser, mit seinem freien Ende in die Kammer hinabreichender Tumor. Gestielt, am unteren Drittel des Septums hängend. Wird als Fibro-angio-myxom beschrieben.

Ugrumow: ♀, 15 J. Anamnese von 2 Monaten, zunehmende Inkomensation. Tumor traubenförmig, gallertig, $7,5 \times 7$ cm. Mit breiter Basis am Foramen ovale aufsitzend. Im rechten Vorhof zwei weitere kleinere, mehr flächenartig ausgebreitete ähnliche Tumoren.

Chiari: ♀, 32 J. Anamnese von 13 Monaten mit Herzvergrößerung, Arrhythmie, Atemnot, Schwellung der Halsvenen. Plötzlicher Tod. Tumor traubenförmig, bernsteingelb, geleeartig, $7 \times 6,5 \times 3$ cm. Stiel 3 mm dick, wächst aus dem Septum etwas unterhalb von der Mündung der V. cava sup. hervor. Verdickte Flecke an der Valv. tricuspidal. und an den Papillarmuskeln derselben. Grosse Embolie von Geschwulstmassen in der rechten Kammer und A. pulmonalis.

Grillo: ♂, 76 J. Klinische Diagnose: Gangraena cruris sin. Tumor graugelb mit unregelmässiger, von kleinen Thrombenauflagerungen aufgerauhter Oberfläche. Gestielt, am hinteren Teil der lateralen Wand lateralwärts von der Mündung der V. cava inf. aufsitzend.

Fossel, Fall 1: ♀, 34 J. Von Jugend auf leichte Herzbeschwerden, in der letzten Zeit Attacken von Herzblock. Tumor apfelgross, tief gefurcht, graugelb-rotgesprenkelt, glasig. Kleinfingernagelgrosse Ansatzstelle vor der Mündung der V. cava inf. in Richtung auf das Herzohr. Thrombose in der V. cava sup. Lungenembolie.

Clerc u. Gen.: ♀, 34 J. Einige Wochen Herzbeschwerden, Inkomensation, Gravidität. Abort, dann zerebraler Insult mit Hemiplegie und Exitus. Tumor papillär, braunrot, weich, 4×3 cm. Durch einen kurzen, dicken Stiel mit dem medialen Teil der Hinterwand verbunden. Grosse Blutungsherde im Gehirn, hämorrhagischen Infarkten ähnlich. Eventuell offenes Foramen ovale wird nicht erwähnt.

Strouse: 63 J. Periodenweise Herzbeschwerden während 43 Jahren. In den letzten 12 Jahren Angina-pectorissymptome. Exitus an Colitis ulcerosa. Tumor gallertig, gelbgrün-blutrot, $8 \times 9 \times 10$ cm, kalkharte Körnchen im Innern. Mit dem Septum verwachsen. Sonst Kardioarteriosklerose und Fibrosis myocardi.

Ausser den oben angeführten Fällen habe ich im neueren Schrifttum Angaben über eine Anzahl weiterer solcher gefunden, welche ich nicht kontrollieren konnte, da mir weder Originalarbeiten noch Referate zur Verfügung standen, nämlich: *Carnot* 1928, *Soria* 1930, *Jenssen* 1934, *Lymburner* 1934, *Montaldo* 1935, *Fawcett u. Ward* 1939, *Raynaud u. Marill* 1939.

Die bisher erwähnten Endokardtumoren hatten so gut wie sämtlich ihre Ansatzstelle am Endokard in einem der beiden Vorhöfe. *Husten* führt einige wenige, ihrem Charakter nach unsichere Fälle an, in welchen der Tumor vom Endokard der Kammern ausging; im neueren Schrifttum habe ich keinen derartigen Fall gefunden. Grössere Bedeutung besitzen indessen die an den *Herzklappen* befindlichen Gebilde, welche gleichfalls als Myxome oder Fibromyxome bezeichnet werden. *Husten* hat 16 solche Fälle zusammengestellt, und ich habe im Schrifttum weitere 13 gefunden (*Leonhart* 1905, *Blumgart* 1907, *Forel* 1910, *Dean u. Falconer* 1913, *Galassi* 1915, *Kornfeld* 1928, *Cilotti* 1929, *Abrahamer* 1931, *Branch* 1931, *Jalesky* 1934, *Masshoff*, Fall 3, 1935, *Spangaro* 1938 und *Eck* 1939). Diese Gebilde, welche an sämtlichen Herzklappen vorkommen, sind meist zierlich papillär, mit Endokardepithel überzogen und haben ein myxomatöses Stroma, welches sich von dem der Vorhofmyxome namentlich dadurch unterscheidet, dass es arm an Blutgefässen ist und solche meistens sogar ganz vermissen lässt. In einigen Fällen sind diese Geschwülste bei

Feten oder Neugeborenen beobachtet worden (Abrahamer, Eck). Aller Wahrscheinlichkeit nach sind sie pathogenetisch nicht mit den Vorhofmyxomen in eine Reihe zu stellen.

Es soll schliesslich darauf hingewiesen werden, dass bei Rindern Tumoren vorkommen, welche sich polypenartig in den Herzraum vorwölben, und die als Myxome oder Fibromyxome bezeichnet worden sind. Sie sind u. a. von Stahr 1910, Magnusson 1915, Bolle 1929 und Mossdorf 1930 beschrieben worden. Ich war ebenfalls in der Lage, einige derartige Tumoren zu untersuchen, welche aus der Lehrsammlung der Veterinärhochschule in Stockholm stammten.¹⁾ Diese Geschwülste weisen allerdings nicht dieselbe eigenartige mikroskopische Struktur auf, wie die Endokardmyxome beim Menschen, sondern sind offenbar ödematöse Fibrome. Aus den Beschreibungen der ebenerwähnten Autoren scheint gleichfalls hervorzugehen, dass es sich um solche Fibrome gehandelt hat.

Eigene Beobachtung.²⁾

R. N., ♀, 40 J. Litt im Alter von 10 Jahren an akutem Gelenkrheumatismus und wurde seitdem leicht kurzatmig, ferner oft Herzklopfen beim Bergaufgehen und Treppensteigen. Pat. wurde 1938 wegen Myoma uteri operiert. Anfang November 1939 Anfälle von krampfartigen Schmerzen in den Waden. Parästhesien und Schmerzen in Armen und Fingern. Gleichzeitig Angstgefühl, Herzklopfen, Druck auf der Brust. Pat. wurde in einem Provinzkrankenhaus Dezember 1939—Mai 1940 stationär behandelt. Man fand dort physikalische Anzeichen einer Mitralstenose, aber keine Inkompensationserscheinungen. Der Urin enthielt Eiweiss, granulierte Zylinder und rote Blutkörperchen. Die SR stieg allmählich auf über 100 mm/st, die Temperatur war subfebril mit vereinzelten Fieberzacken bis 39°. Pat. hatte 1939 bereits an Parese und Sensibilitätsstörungen

¹⁾ Diese Präparate hat mir Herr Präsektor S. Rubarth freundlichst zur Verfügung gestellt.

²⁾ Gemeinsam mit L. Kirstein bei der Tagung der Schwedischen Vereinigung für Innere Medizin am 13. September 1940 mitgeteilt (Nordisk Medicin, Bd. 10. S. 1664, 1941). Auch vom Verf. bei der Tagung der Schwedischen Pathologenvereinigung am 25. Oktober 1941 demonstriert.

in der rechten Hand gelitten, und 1940 kamen Steigerung der Reflexerregbarkeit auf der ganzen linken Seite, linksseitiger positiver Babinski, linksseitige Fazialisparese zentralen Typs, undeutliche Sprache und periodenweise Bewusstseinstörung hinzu. Ihr Allgemeinzustand verschlimmerte sich ständig, sie nahm 23 kg ab. Als Pat. Ende Mai 1940 in die neurologische Klinik des Serafimerlazarets in Stockholm aufgenommen wurde, wies sie in Kürze folgendes klinisches Bild auf: Äusserst abgemagert, blass. Keine Zyanose, Dyspnoe oder periphere Ödeme, aber Trommelschlegelfinger und Uhrglasnägel. Herzgrenzen $9 + 2,5$ cm, präkordiale Pulsation, prä-systolisches schwirrendes Geräusch, prä-systolisches Crescendogeräusch, systolisches und diastolisches blasendes Geräusch. Herzrhythmus regelmässig, Blutdruck 95/75. Leber und Milz nicht palpabel. Dem Elektrokardiogramm nach wurde eine Koronarinsuffizienz angenommen, die Röntgenuntersuchung des Herzens ergab Vergrösserung, hauptsächlich des linken Vorhofs. Grundumsatz $+ 42\%$. Wiederholte Blutkulturen negativ. Blutbild normal. SR 110 mm/st. Temperatur subfebril. Sensorium periodenweise stark getrübt, Aphasie, Akinesie. Leichte linksseitige Fazialisparese, allgemein herabgesetzte grobe Kraft der Extremitäten mit gesteigerten Reflexen, Zahnradsymptom am rechten Ellenbogen. Babinski links positiv. Grobschlägiger Tremor der Arme und Hände. Die Lumbalpunktion ergab klaren Liquor unter normalem Druck, keine Zellen, keine Eiweissvermehrung. Bei Enzephalographie fand man einen mässig erweiterten linken Seitenventrikel sowie eine 4×3 cm grosse luftgefüllte Höhle lateral im hinteren Teil des linken Stirnlappens.

Der Allgemeinzustand verschlimmerte sich dann mehr und mehr, es stellten sich Lungenrasseln und hohes Fieber ein. In der ersten Juliwoche 1940 erfolgte der Tod.

Die klinische Diagnose war Endocarditis lenta.

7.7.1940 *Obduktion* (Serafimerlazarett, Obd.-Nr. 163/1940), Auszug aus dem Protokoll: Körperlänge 160 cm, Fettpolster und Muskulatur sehr hochgradig reduziert, Hautfarbe äusserst blass, keine peripheren Ödeme. Totale fibröse Perikardsynechie. Das Herz wiegt 375 g, ist schlaff und allgemein dilatiert. Leichte Hypertrophie der linken Kammerwand. Der erweiterte *linke Vorhof* wird von einer hühnereigrossen (ca. $6 \times 4 \times 4$ cm) grauroten bis graugelben, gallertigen, papillomatösen Masse ausgefüllt, welche an eine Blasenmole erinnert (Abb. 1). Das Gebilde ist an der Oberfläche mit lockeren Blutgerinnseln belegt. Dasselbe sitzt mit einem fibrösen, grauweissen und glattwandigen Stiel am Vorhofseptum auf. Die eigentliche papillomatöse Masse wird durch zwei tiefe Einschnitte in 3 Hauptlappen geteilt; die kleineren, traubenähnlichen Papillen an der Oberfläche sitzen oft lose und fallen bei Berührung ab. Der Stiel ist

kegelförmig und besteht teilweise aus einer trichterartigen Ausziehung des Vorhofseptums, der also eine Einstülpung an der Septumfläche des rechten Vorhofs entspricht. Diese Vertiefung nimmt die Pars membracea septi ein und wird vorn vom Limbus fossae ovalis begrenzt. Das Foramen ovale ist geschlossen. Im linken Vorhof weist das Septum rings um den Tumorstiel unregelmässig ausgedehnte porzellanweisse Endokardverdickungen auf. Der Stiel-



Abb. 1.

Das papilläre, tief zerklüftete, am Septum aufsitzende tumorähnliche Gebilde im linken Vorhof.

ansatz ist 3 cm oberhalb der Basis der medialen Mitralklappe gelegen. Herzklappen und übriges Endokard sind normal. Die Kranzgefässe zeigen leichte atheromatöse Veränderungen, keine Thromben oder Embolien. In der Hinterwand der linken Kammer fleckige Myokardfibrose in einem 3 × 4 cm grossen Gebiet.

Sonstige Obduktionsbefunde: Leichte schleimige Bronchitis. Die Milz wiegt 250 g, weist chronisches Stauungsbild, fibröse Perisplenitis und wenigstens 5 bis hühnereigrosse, trockene, anämische Infarkte auf. In den Nieren mehrere bohnen-grosse, ziemlich frische anämische Infarkte und einige Infarktnarben. Im Magen ein paar Schleimhautblutungen. Am Mesenterialrand des Dünndarms findet man 4 kleine blaurote Infiltrate, welchen erbsengrosse blaurote Knötchen in der Submukosa des Darms entsprechen. In der Leber, welche das Bild einer leichten chronischen Stauung aufweist, werden mehrere

im Querschnitt markstückgrosse, bunte Infarkte jüngeren Datums und im Anschluss an diese an 4 Stellen höchstens erbsengrosse, blass-graurote Herde angetroffen, welche den Eindruck von Pfröpfen in Lebergefässen machen. *Uterus* supravaginal amputiert. *Thyreidea* mässig vergrössert, mit kleineren Adenomen. Das *Gehirn* zeigt folgende Verhältnisse: In der linken A. vertebralis ein ca. 3 cm

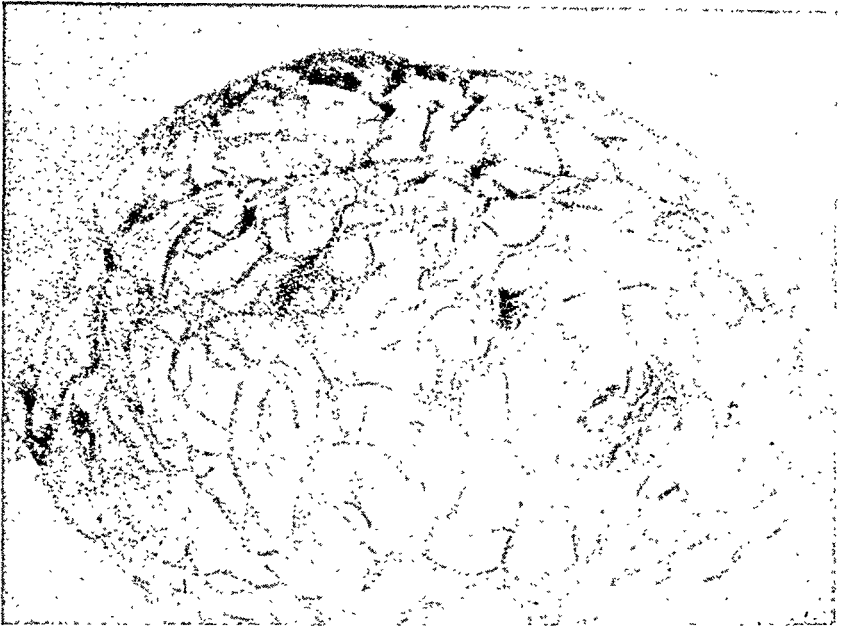


Abb. 2.

Rechte Hirnhemisphäre bei Verf.s Fall. Arachnoidale Blutungsherde rings um graurote, im Anschluss an Gefässe gelegene Knötchen.

langer, obturierender, dunkelroter Thrombus. In der rechten A. cerebri media ein ähnlicher Thrombus, welcher etwa 1 cm von der Abzweigungsstelle beginnt und sich in periphere Äste fortsetzt. An der Konvexität der rechten Hemisphäre eine Anzahl erbsen- bis 5markstückgrosser arachnoidaler Blutungsherde mit einem Stich ins Braune. Zentral in mehreren derselben sieht man die äusserste Partie von Blutergüssen, welche aus der Tiefe durch die Hirnrinde vordringen. An einigen Stellen im rechten Hinterhauptslappen und an einer im rechten Schläfenlappen finden sich erbsengrosse, von Hirnhautblutungen umgebene Herde, welchen beim Einschnitt hell-graurote Pfröpfe in arachnoidalen Gefässen entsprechen (Abb. 2). Im rechten Schläfenlappen wird auch eine eingesunkene, 2mark-

stückgrosse Partie mit gelbbrauner Rinde von »wurmstichigem« Aussehen bemerkt. An der Konvexität der linken Hemisphäre einige kleinere, frische arachnoidale Blutungsherde. Auf Frontalschnitten des Gehirns sieht man im rechten Stirnlappen eine hühnereigrosse Malazie jüngeren Datums von teilweise hämorrhagischem Typ, im rechten Schläfenlappen einen hühnereigrossen, ziemlich frischen Erweichungsherd mit einem scharf begrenzten, walnussgrossen Bluterguss, welcher bis zur Rindenoberfläche reicht.

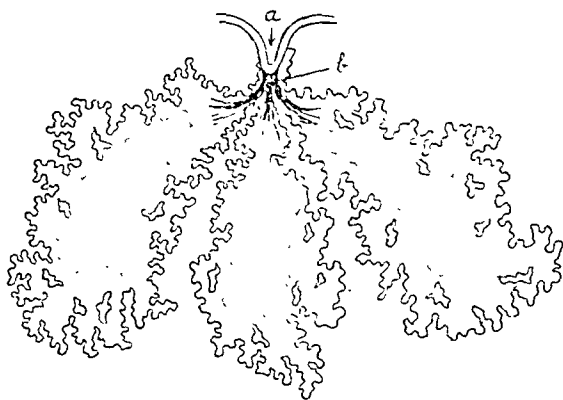


Abb. 3.

Schematische Rekonstruktion der Struktur des sog. Endokardmyxoms. a) trichterförmige Ausziehung des Vorhofseptums, b) fibröser Stiel.

Im rechten Hinterhauptslappen einige kleinere hämorrhagische, an den arachnoidalen Gefässpfropfen lokalisierte Rindenmalazien. In der linken Capsula interna neben dem Putamen eine reichlich bohnergrosse, zum Teil zystische, ältere Malazie.

Mikroskopische Untersuchung: Abb. 3 zeigt ein schematisiertes Übersichtsbild des Tumors. Die Basis des kegelförmigen Stiels besteht aus einer trichterartigen Vorwölbung des Vorhofseptums. Die Fortsetzung des Stiels, welche solides fibröses Gewebe enthält, teilt sich bald und geht in die 3 Hauptlappen über, welche den eigentlichen Tumor bilden. Das Tumorgewebe »kriecht« indessen an der Aussenseite des Stiels entlang, so dass Ausläufer desselben den Septumtrichter teilweise bedecken. Ein ins einzelne gehendes Studium der Stielpartie ergibt folgendes: An der Aussenseite des Septumtrichters ist das Endokard durch ein Intimakissen erheblich verdickt, welches reichlich feine elastische Fasern enthält. Der eigentliche Stiel besteht aus grobfasrigem hyalinem Bindegewebe.

das sehr arm an Elastin ist. Dieser solide Stiel scheint gänzlich ein Produkt des Endokards zu sein, denn die elastische Grundmembran des Endokards geht an der Spitze des Septumtrichters ohne Abbruch an der Stielbasis vorbei (Abb. 4). Weiter peripherwärts strahlen die groben Bindegewebsbündel des Stiels in das eigentliche Tumorgewebe aus und lösen sich in diesem auf. Im Stiel findet man

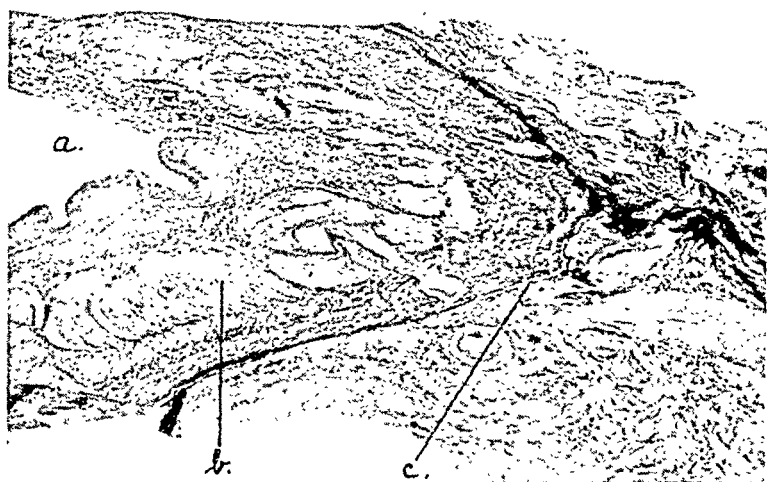


Abb. 4.

Detailbild des Stiels. Links die Vorhofswand an der Spitze der trichterförmigen Ausziehung, rechts die Basis des Bindegewebsstiels. Bei a Lumen des rechten Vorhofs in der Trichterspitze. Bei b Muskulatur des Vorhofseptums, bei c elastische Basalmembran des Endokards, welche ohne Abbruch unter der Basis des Stiels entlanggeht. Färbung: Weigerts Elastin-v. Gieson.

eine Anzahl mittelgroße Gefäße mit unregelmässiger Wandstruktur, am ehesten vom arteriellen Typ, sowie reichlich Haufen grobscholligen Hämosiderinpigments.

Die Hauptmasse des Tumors weist folgendes Bild auf: Die peripheren, papillär geformten Teile werden von einer hyalinen voluminösen Masse gebildet, in die Stränge und Haufen von Zellen eingesprengt sind. In den zentralen Teilen besteht das Gewebe aus einem Maschenwerk von dicht verbackenen Fibrinmassen, welche Anhäufungen mehr oder weniger aufgelöster roter Blutkörperchen umspinnen. Diese zentrale Masse bildet ein Gerüst mit Ausläufern

in die verschiedenen Papillen (Abb. 5). Auch im zentralen »Gerüst« finden sich jedoch eingesprengte Partien von hyaliner Substanz mit Zellen in Haufen und Strängen, und in den peripheren hyalinen Massen sieht man hier und da Ansammlungen von roten Blutkörperchen und Fibrin.

Ein ins einzelne gehendes Studium der hyalinen Substanz er-



Abb. 5.

Peripherer papillärer Teil des Gebildes. Ein zentrales Gerüst von Fibrin und roten Blutkörperchen verzweigt sich in den Papillen, welche aus einer hyalinen, schwach gefärbten Masse bestehen.

Fibrinfärbung n. Kochel.

gibt, dass dieselbe erst bei sehr starker Vergrößerung eine undeutlich gekörnte Struktur erkennen lässt. Sie weist eine schwache Pikrinophilie und gleichzeitig (bei Hansens Bindegewebsfärbung) eine Andeutung von Fuchsinophilie auf, namentlich in der Nähe der Zellen. Bei Eosinfärbung wird dieselbe schwach rosa. Amyloidfärbung negativ. Bei Silberfärbung treten ein äusserst feinkörniger Silber Niederschlag und einige feine Faserstrukturen hervor. Bei Färbung mit Thionin kommt eine mässige und mit Toluidinblau nach *Sylvén* (mit alkoholhaltiger Farblösung) eine deutliche Metachromasie zum Vorschein.

Die in dieser Substanz liegenden Zellen sind vor allem durch ihre Tendenz gekennzeichnet, Synzytien zu bilden. Letztere sind

meist strangförmig, manchmal Y-förmig verzweigt. Sie haben ein spärliches Zytoplasma und enthalten bis etwa 20 runde oder ovale, meistens chromatinarme und bläschenartige Kerne. Einige runde Zellklumpen sind offenbar Querschnitte strangförmiger Synzytien. Ausserdem finden sich vereinzelt Zellen mit bläschenförmigem Kern und undeutlichem Zytoplasma in der hyalinen Substanz verstreut.

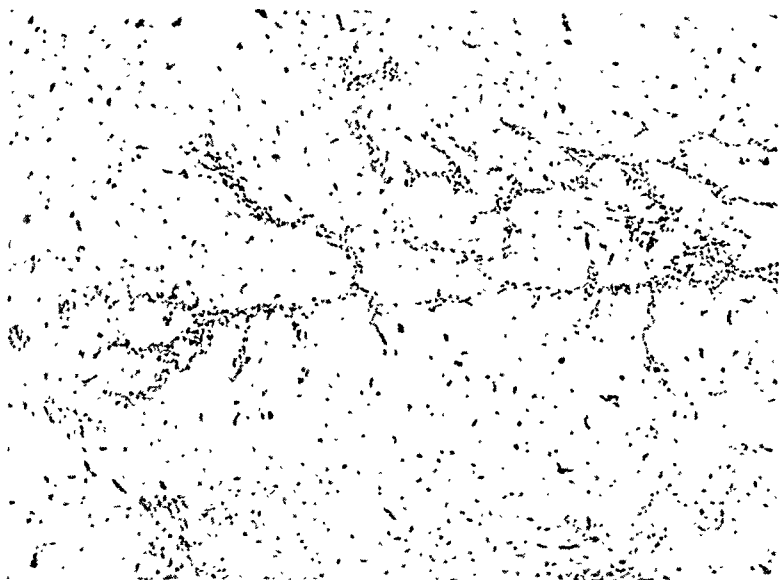


Abb. 6.

Partie aus dem peripheren papillären Teil des Gebildes. In einer hyalinen Grundsubstanz sieht man teils verstreute Zellen und synzytiale Verbände, teils netzförmig verzweigte Zellsynzytien. Htx.-v. Gieson.

An vielen Stellen bilden die Zellsynzytien reichlich verzweigte, zusammenhängende Systeme etwas größerer Stränge (Abb. 6 u. 7). Diese Stränge weisen ab und zu eine undeutliche Lumenbildung auf, und man kann in diesem Lumen rote Blutkörperchen oder eine hyaline Masse unterscheiden, welche sich wie Hämoglobin färbt. An der Oberfläche der Papillen bilden die Zellsynzytien oft einen endothelähnlichen Überzug, und bisweilen findet man im Innern der Papillen mit Erythrozyten gefüllte und mit einer derartigen Zellschicht ausgekleidete Hohlräume. Es liegen beträchtliche Schwankungen in der Grösse und im Chromatingehalt der Zellkerne vor, namentlich in den oberflächlichsten Teilen der Papillen. Mitosen wurden nicht beobachtet.

Die Untersuchung der Infarkte in Milz, Leber und Nieren sowie der hämorrhagischen Herde in der Darmwand macht ersichtlich, dass es sich hier um *arterielle Geschwulstembolien verschiedenen Alters* handelt. So findet man in den *Darmherden* ein Beispiel von frischer Embolisierung. Eine stark ausgespannte Arterie wird fast gänzlich von einem Gewebstück ausgefüllt, dessen Bau völlig mit

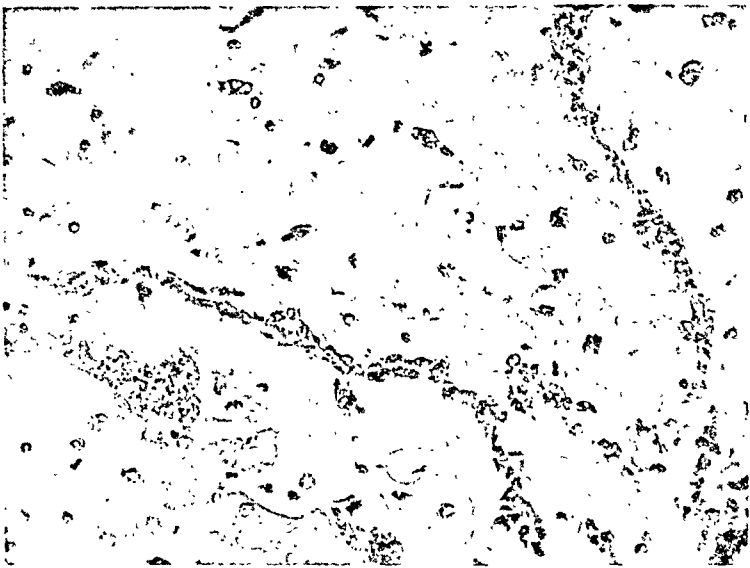


Abb. 7.

Partie aus dem peripheren Teil des Gebildes. Die synzytialen Zellstränge ähneln unregelmässig gebauten kapillaren Gefässen mit partieller Lumenbildung. Die zwischen den Strängen verstreuten Verbände sind Synzytien. Links unten eine Fibrinmasse.

Htx.-v. Gieson.

dem der peripheren, papillären Teile der Herzgeschwulst übereinstimmt. Die Muscularis und Elastica interna der Arterienwand sind erhalten, aber die Intima ist schwer zu unterscheiden, da ihre Lamellen aufgespalten sind, und ihr Endothel ausgefranst und mit synzytialen Zellverbänden aus der Geschwulstembolie vermenget ist. An der Spitze eines *Milzinfarkts* sieht man eine Arterie, die von einer Masse ausgefüllt wird, welche etwas zellreicher ist als die peripheren Partien der Herzgeschwulst, sonst diesen aber völlig gleicht. Diese Masse umgibt eine Reihe von blutgefüllten Hohlräumen, und ihre Zellen überziehen die Wandungen der letzteren. Die Geschwulstmasse hat bei dieser Embolie die Intima und Media

der Arterie in grosser Ausdehnung zerstört und spannt die adventitielle Bindegewebsscheide dermassen aus, dass eine Art dissezierendes Aneurysma gebildet wird, welches von Geschwulstmasse und den oben erwähnten Bluträumen ausgefüllt wird (Abb. 8 u. 9). Schliesslich findet man an einer Reihe von Orten (Milz, Leber,



Abb. 8.

Arterie an der Spitze eines Milzinfarkts. Das Gefäss wird von einer Embolienmasse mit einem Bau wie der der Papillen des Herztumors und in dieser eingeschlossenen blutgefüllten Hohlräumen ausgefüllt. Links sind Intima und Media der Arterie erhalten, aber bei a und b unterbrochen. Die Adventitia geht ohne Abbruch rings um das Gefäss, ist aber gedehnt. Es hat sich also eine Art von Aneurysma dissecans gebildet. Htx.v.-Gieson, kombiniert mit Weigerts Elastin.

Niere) *ältere Geschwulstembolien*. Abb. 10 stellt ein Übersichtsbild einer solchen in der Leber dar. Man sieht einen hauptsächlich aus dichtem Bindegewebe bestehenden Herd, der sich weit über die Wände der ursprünglichen Arterie hinaus erstreckt, von welchen man Reste im Herd zerstreut sieht. In einer Ecke des ehemaligen Arterienlumens befindet sich ein blutgefüllter Raum, der einem gewöhnlichen Rekanalisationslumen ähnelt. Im übrigen sieht man — teilweise im Innern des ursprünglichen Arterienlumens, aber teilweise auch ausserhalb desselben und neben einem Rest der Ar-



Abb. 9.

Partie aus Abb. 8 bei a (stärkere Vergrößerung).



Abb. 10.

Ältere Embolie in der Leber. Man sieht eine Bindegewebsmasse mit eingeschlossenen Resten der Arterienwand. Bei a unregelmässige Lumina. Htx.-v. Gieson.

terienwandung — ein System von unregelmässig geformten, nicht mit Blut gefüllten Hohlräumen, welche mit regellos gestalteten Zellsynzytien ausgekleidet sind, die an die im Herzmyxom vorkommenden erinnern (Abb. 11).

Die mikroskopische Untersuchung des *Gehirns* liefert folgende



Abb. 11.

Partie aus Abb. 10 bei a, stärker vergrössert. Die Lumina sind mit einer — oft dicken — synzytialen Zellschicht ausgekleidet; aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich um einen Rest der synzytialen Zellen des ursprünglichen Emboliegewebes.

Ergebnisse: In Abb. 12 findet man ein Übersichtsbild eines der grau-roten Knötchen, welches makroskopisch wie ein Pfropf in einem arachnoidalen Gefäss aussah. Man sieht nun, dass das Knötchen in der Arachnoidea an einem frischen Blutungsherd in der Hirnrinde gelegen ist. Das Knötchen liegt indessen nicht in einer Arterie, sondern rings um eine solche, deren Wände teilweise zerstört sind. Im Innern der Arterie findet man ein gut erkennbares Geschwulstgewebe. Das Gewebe ausserhalb der Arterie besteht aus grösseren und kleineren Ansammlungen roter Blutkörperchen, welche in einer abwechselnd hyalinen und faserigen, Fibrin enthaltenden Masse liegen. In dieser Masse finden sich auch reichlich Haufen und Strän-

ge synzytialer, den in der Herzgeschwulst ähnlicher Zellen. Die Zellen treten in der Nähe der embolisierten Arterie, deren Wände von ihnen durchwachsen werden, am reichlichsten auf. In der angren-



Abb. 12.

Arachnoidaler Herd aus dem rechten Hinterhauptslappen. Bei a Hirnrinde, bei b kollaterale Rindenblutung, bei c Arachnoidea mit Blut und Hämosiderinpigment, bei d eine meningeale, Embolienmasse enthaltende Arterie mit hochgradig zerstörter Wand. Das Knötchen selbst besteht aus einem Gemisch von Fibrin, Blut (bei e eine grössere Blutansammlung) und synzytialen Zellen, welche offenbar aus der Arterienembolie herausgewachsen sind.

zenden Hirnhaut ist Hämosiderinpigment in grösseren Mengen abgelagert. Auch andere grössere kortikale Blutungsherde im Schläfen- und Stirnlappen erweisen sich als an Arterien gebunden, welche mit einer synzytiale Zellen enthaltenden hyalinen Masse ausgestopft sind. Auch hier kann man konstatieren, dass derartige Zellen, wenn auch in weniger reichlicher Anzahl, die Blutungsherde durchsetzen. Die grössten Blutergüsse scheinen indessen aus einer reinen Blutmasse zu bestehen, welche von malazisch verändertem Hirnparenchym umgeben wird.

Übersicht über die pathologische Anatomie der
»Endokardmyxome«.

Diese Zusammenstellung gründet sich auf 34 der Fälle aus dem älteren Schrifttum, welche *Husten* referiert hat,¹⁾ sowie auf die oben von mir angeführten 36 Literaturfälle nebst meinem eigenen, insgesamt 71 Fälle.

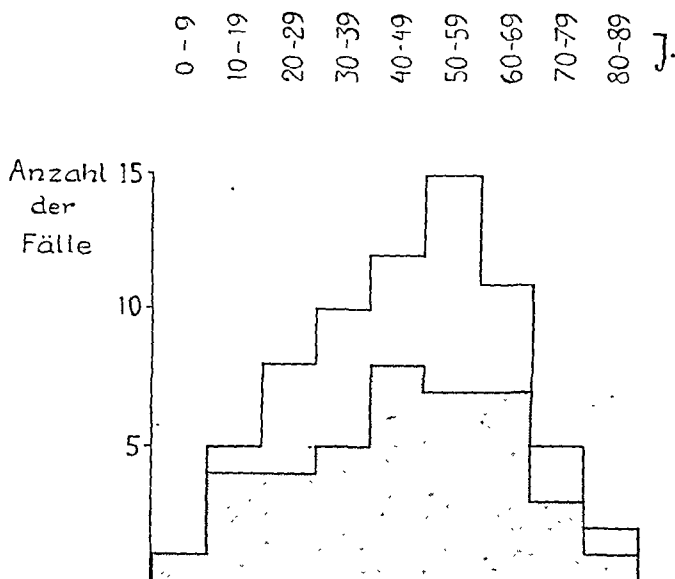


Abb. 13.

Alters- und Geschlechtsverteilung bei 69 Fällen von Endokardmyxom. Frauen schattiert.

Geschlechts- und Altersverteilung (siehe Abb. 13): Die Geschlechtsverteilung ist eine gleichmässige, ebenso die Altersverteilung. Die jüngste Patientin war ein 4jähriges Mädchen (*Meyer-Jacobsthal*), der älteste Kranke ein Mann von 83 Jahren (*Trespe*).

¹⁾ Diese Fälle sind folgende: *Ribbert*, *Staffel*, Fall 1 u. 2, *Lorne*, v. *Bamberger*, *Köster*, *Salvioli*, *Bostroem*, *Martinotti*, *Jürgens*, Fall 2 *Jäger*, Fall 1, *Berthenson*, *Robin*, *Marchand*, *Jacobsthal*, *Trespe*, *Blochmann*, *Thompson* u. *Atchinson*, Fall 1 u. 2, *Baechmeister*, *Brenner*, *Hagedorn*, Fall 2, *Karrenstein*, *Escher*, Fall 2, *Hiess*, *Winkler*, *Jakubson*, *Meroz*, Fall 1 u. 2, *Saltykow*, *Bergstrand*, *Jellinek*, Fall 1 u. 2, *Louria*.

Lokalisation: In sämtlichen Fällen war der Tumor im Vorhof lokalisiert, und zwar in 60 Fällen im linken, in 11 im rechten. *Husten* hat zwar in seine Zusammenstellung eine kleine Anzahl von Fällen mit Lokalisation in den Herzkammern aufgenommen, hält aber selbst keinen derselben für ein wirkliches Myxom, und ich bin zu der gleichen Ansicht gekommen. Es ist ferner auffallend, dass der Tumor bei dem grössten Teile der Fälle vom Septum ausgegangen ist (bei wenigstens 45 von den 60 Geschwülsten im linken Vorhof; bei 7 von den 11 im rechten). Die nächsthäufigste Lokalisation ist die Hinterwand des linken Vorhofs, unterhalb oder zwischen der Mündung der Pulmonalvenen (8 Fälle). Fast die Hälfte der vom Septum ausgehenden Tumoren hatten ihre Ansatzstelle in der Fossa ovalis selbst, am Limbus ovalis oder dicht daneben, die übrigen meistens unterhalb und vor der Fossa ovalis. In 2 Fällen (*Nowicki, Houck-Bennett*) stand das Foramen ovale offen.

Makroskopische Anatomie: Die bezeichnendste Eigenschaft der Tumoren ist ihre gallertige, schleimartige Konsistenz. Die Farbe wird in verschiedenen Fällen als bernsteingelb, gelbrot, braunrot etc. bezeichnet. Oft wird eine auf frischen Blutungen beruhende dunkelrote Fleckigkeit angegeben. Die Form ist äusserst wechselnd. Man kann zwei Haupttypen unterscheiden: a) schmalgestielte, papilläre, oft mit tiefen Einziehungen versehene, traubenförmige Gebilde (Abb. 1), b) mit mehr oder weniger breiter Basis aufsitzende, rundliche Tumoren mit ganz glatter oder weniger ausgeprägt papillärer Oberfläche. Jener Typ ist häufiger; bei den hier zusammengestellten Tumoren wird derselbe von rund 40 Fällen verkörpert, während etwa 15 zum zweiten Typ gehören. In den übrigen Fällen ist die makroskopische Beschreibung unvollständig. In einer Anzahl Fälle fanden sich frische Thrombenbeläge auf der Tumoroberfläche. Bei den gestielten Tumoren ist der Stiel stets fibrös, weissglänzend. Derselbe pflegt einige Millimeter bis 1 cm dick und höchstens 1,5 cm lang zu sein. Oft gehört zum Stiel eine trichterförmige Ausziehung des Vorhofseptums. Beim Durchschneiden der gestielten Tumoren

wurde in gewissen Fällen eine baumförmige Verzweigung fibröser Züge aus dem Stiel in die Papillen hinein beobachtet.

Die Grösse der Tumoren schwankt stark. Die grössten sind von *Strouse* (rechter Vorhof, $8 \times 9 \times 10$ cm) und *Norton* (linker Vorhof, $9,5 \times 8,5$ cm) beschrieben worden. Auch *Meyer-Jacobsthals* Tumor bei einem 4jährigen Mädchen mit den Massen $6 \times 3 \times 3$ cm ist beachtenswert. Bei einer grossen Anzahl der Geschwülste wird eine Grösse wie die einer Mandarine, eines Gänse- oder Hühnereis angegeben. In einigen Fällen von langgestreckten Tumoren ist eine Länge von 10 cm festgestellt worden (*Weltmann, Escher*). Diese grossen Geschwülste waren oft mit ihrem peripheren Teil durch das Mitral- bzw. Tricuspidalostium abwärtsgedrungen, und in einigen Fällen hatte sich die Lage des Ostiums durch eine Schnürfurche in der weichen Tumormasse markiert. Andererseits sind eine Reihe Myxome von nur Kirsch- oder Haselnussgrösse beschrieben. Die kleinsten Vorhofmyxome sind *Staffels* Fall 1 (rechter Vorhof, $0,6 \times 0,8$ cm), *Trespes* und *Thompson-Atchinsons* Fall (beide im linken Vorhof, etwa 1 cm im Querschnitt).

Mikroskopische Anatomie: Das für diese Geschwülste charakteristische Gewebe besteht aus einer voluminösen Grundsubstanz, in der synzytiale Zellstrukturen liegen. Die Grundsubstanz erscheint bei mittelstarker Vergrösserung hyalin, bei starker undeutlich feinkörnig oder fasrig. Sie wird von Pikrinsäure schwach gelb, von Eosin rosa und bei Malloryfärbung blassblau oder violett gefärbt. Bei meinem Fall liess sich auch in der Nähe der in der Grundsubstanz liegenden Zellstränge eine leichte Fuchsinophilie konstatieren. Vereinzelt als Fibrin färbbare Fasern traten ferner hervor, und ebenso äusserst feine argentophile Körnchen und Fibrillen. Gewisse Autoren haben auch elastische Fasern gefunden (*Guldberg, Grillo, Chiari* u. a.), welche bei meinem Fall fehlen. Die meisten Autoren geben an, dass die Substanz mit Muzikarmin oder Thionin positive Schleimreaktion gibt; nach anderen ist die Reaktion stellenweise positiv (*Yater, Bacaloglu, Kalbfleisch* u. a.). In einer kleinen Anzahl von Fällen wird gänzlich negative Reaktion mit besagten Farbstoffen erwähnt.

Bei dem von mir untersuchten Tumor fanden sowohl die Thionin- wie die Toluidinblaufärbung nach *Sylvén* Verwendung, wobei eine deutliche Metachromasie hervortrat.

Die *zelluläre Komponente* im Tumor ist von eigenartigem Typ. Die meisten Autoren geben an, dass die Zellen spindelförmig, »dreischwänzig«, oder Sternzellen sind. Ausserdem sollen vielkernige Riesenzellen vorkommen. Man betont auch das reichliche Vorhandensein dünnwandiger kapillarer Gefässe, welche einige Autoren als junge oder als von embryonalem Typ bezeichnen (*Wasilieff*, *Bien-Ch'in* u. a.). Die Ansicht, zu welcher ich beim Studium meines Falls gekommen bin, ist folgende: In der hyalinen Grundsubstanz wächst ein einheitlicher Typ von Zellen mit ausgeprägt synzytialen Eigenschaften. Die Zellen bilden netzförmig verzweigte synzytiale Stränge, gewöhnlich mit zwei oder drei Kernen nebeneinander (Abb. 6 u. 7). Diese Stränge ähneln gewissermassen Blutkapillaren, indem sie hier und da Lumenbildung aufweisen, wobei man im Lumen einige wenige rote Blutkörperchen unterscheiden kann. Von den Strängen gehen solide synzytiale Knospen aus, welche in vielen Fällen in den Schnitten wie isolierte riesenzellenähnliche Klumpen aussehen. Die peripheren Ausläufer dieser Synzytien treten als Y-förmige oder spindelförmige Zellverbände mit einem oder wenigen sichtbaren Kernen in Erscheinung (Abb. 7). (Eine in vielen Punkten mit dieser übereinstimmende Beschreibung haben *Wasilieff*, *Ugriumow*, *Kalbfleisch*, *Riopelle* gegeben). An den oberflächlichen Partien des Tumors bilden die synzytialen Zellen oft einen endothelähnlichen Überzug, und man findet in den peripheren Teilen nicht selten blutgefüllte, mit einer derartigen Zellschicht ausgekleidete Hohlräume; wahrscheinlich handelt es sich um Einstülpungen der papillären Oberfläche. Die Kerne der synzytialen Zellverbände weisen recht erhebliche Grössenvariationen auf, sie sind rund oder oval, ziemlich chromatinarm und haben ein bläschenartiges Aussehen. Mitotische Kernteilung wird nicht beobachtet.

Neben dem oben geschilderten Gewebe enthält indessen der Tumor noch eine Komponente, nämlich eine aus einem Ma-

schenwerk von Fibrinfasern, welche Ansammlungen roter Blutkörperchen in verschiedenen Stadien der Dehämoglobinisierung und des Zerfalls umgeben, bestehende Masse. In dem von mir untersuchten papillären Tumor bildet diese Masse in grossen ganzen ein zentrales Gerüst mit sich in die Papillen erstreckenden Ausläufern (Abb. 5). Doch vermischen sich die beiden Komponenten bis zu einem gewissen Grade miteinander, so dass man in der hyalinen Grundsubstanz Ansammlungen von roten Blutkörperchen und Fibrinfasern sowie in Fibrinmassen der zentralen Teile Partien von hyaliner Substanz mit Zellsynzytien antrifft.

In den Fällen, wo der Tumor gestielt ist, besteht der Stiel aus einem groben kollagenen Bindegewebe mit vereinzelt elastischen Fasern und mehr oder minder reichlicher Einlagerung von Hämosiderinpigment. Die kollagenen Bindegewebsfasern des Stiels treten divergierend in die zentrale hämorrhagisch-fibrinöse Masse der Geschwulst ein, verschwinden aber nach kurzem Verlauf. Im Stiel finden sich auch Blutgefässe reifen Typs und mit ziemlich unregelmässiger Wandstruktur; sie ähneln am ehesten Arterien. Auch diese Blutgefässe lassen sich keine längere Strecke in die zentrale Partie der Geschwulst verfolgen. In mehreren Fällen kann man beobachten, dass das Vorhofseptum trichterförmig ausgezogen ist und die kegelförmige basale Partie des Stiels bildet. Man kann indessen sehen, dass die elastische Basalmembran des Endokards ohne Abbruch unter der Basis des eigentlichen Stiels verläuft (Abb. 4), und Muskelfasern kommen im letzteren niemals vor.

Was denjenigen Typ von Endokardmyxomen betrifft, welche mit breiter Basis aufsitzen und eine glatte Oberfläche haben, so kann sich Verf. in Ermangelung eigenen Materials kein klares Bild von der architektonischen Verteilung des myxomähnlichen Gewebes und der hämorrhagisch-fibrinösen Komponente machen. Aus oft summarischen Beschreibungen verschiedener Autoren erhält man den Eindruck, als ob auch hier die letztere hauptsächlich zentral gelegen sei, und dass

größere, von kollagenem Bindegewebe begleitete Gefässe in »breiterer Front« aus dem Endokard in dieselbe einwachsen.

Sonstige Obduktionsbefunde: In ungefähr einem Drittel der Fälle von gestieltem Tumor im linken Vorhof wird angegeben, dass das Endokard in der Nähe des Tumorstiels eine unregelmässig ausgedehnte fibröse Verdickung aufweist. Bei Fällen von Tumor im linken Vorhof wurden achtmal fibröse Endokarditiden an den Mitralklappen (in einigen Fällen mit Stenose) beobachtet. Bei einem Fall von Tumor im rechten Vorhof waren fibröse Flecke an den Tricuspidalklappen vorhanden. Das Herz wies — natürlich neben der Dilatation des betreffenden Vorhofs bei den grösseren Geschwülsten — oft eine Hypertrophie, namentlich der rechten Kammer, auf. Es gibt indessen mehrere Fälle, bei welchen kaum eine Herzhypertrophie vorlag. Kardio-Arteriosklerose und Myokardfibrose sind bei einigen der älteren Patienten konstatiert worden, und in vereinzelten Fällen (z. B. bei meinem Fall) Myokardfibrose ohne erheblichere Kranzgefässsklerose. In der Mehrzahl der Fälle werden mehr oder weniger ausgesprochene venöse Stauungserscheinungen in den einzelnen Organen, Hydrops in Körperhöhlen und periphere Ödeme angegeben.

Von besonderem Interesse sind die *Embolien*, welche nicht selten beim Endokardmyxom auftreten. Unter den 71 Fällen, welche ich sammeln konnte, waren Anzeichen von Embolie in folgenden vorhanden:

Bei Myxom des linken Vorhofs: Marchand (zerebrale Embolie), Blochmann (Infarkte in Nieren, Milz und Dünndarm), Thompson-Atchinson, Fall 2 (zerebrale Embolie), Meroz, Fall 1 (zerebrale Embolie), Binder (alte Niereninfarkte), Schwarz (alte Infarkte in Nieren und Milz), Feller (zerebrale Embolie), Ludwig (Niereninfarkt), Gorlitzer (zerebrale Embolie), Masshoff, Fall 3 (Emboli in der unteren Aorta und den Aa. iliacae), Kalbfleisch (zerebrale Embolie) und Ringertz (zerebrale Embolie sowie Emboli in verschiedenen Bauchorganen). Bei einigen weiteren Fällen (Robin, Jellinek, Fall 1, Norton) hatten klinische Anzeichen von zerebralen Embolien vorgelegen, welche jedoch infolge von unvollständiger Obduktion nicht verifiziert wurden.

Bei Myxom des rechten Vorhofs: Chiari (Emboli in der rechten Kammer und A. pulmonalis), Fossel, Fall 1 (Emboli in der A. pulmonalis).

Insgesamt liegen also bei 12 von 60 Fällen von Myxom des linken Vorhofs anatomisch verifizierte Anzeichen von Emboli im grossen Kreislauf vor, und bei 2 von 11 mit Tumor im rechten Vorhof Emboli im Lungenkreislauf, ein, wie man sieht, übereinstimmendes Verhältnis. Es lässt sich indessen nur in einem Teil der Fälle aus der Beschreibung klar entnehmen, dass es abgelöste Geschwulstteile waren, welche die Embolien verursacht hatten. So verhält es sich jedoch bei den Fällen von *Gorlitzer*, *Masshoff*, *Kalbfleisch*, *Ringertz* und *Chiari*. Bei diesen konnte man in Gefässen hellgelbe oder graurote gallertige Pfröpfe beobachten, welche mikroskopisch als Myxomgewebe verifiziert wurden. Es ergibt sich, dass der Tumor bei den meisten von den Emboliefällen zu dem gestielten, traubenförmigen Typ gehört, und in einigen Fällen waren am Haupttumor »Bruchflächen« nach Abriss von Papillen zu konstatieren.

Der von mir untersuchte Fall ist der einzige, bei dem arterielle Geschwulstembolien verschiedenen Alters mikroskopisch studiert worden sind, und wo man sich also einen Begriff von den weiteren Schicksalen der Embolien zu bilden in der Lage war. Es wurden da Bilder gefunden, welche keine andere Deutung gestatten als die, dass das embolische Gewebe unter Zerstörung der Intima und Media der Arterien selbständig wuchert, so dass eine Art dissezierendes Aneurysma entsteht, mit Geschwulstgewebe und Blut gefüllt und von dem gedehnten adventitiellen Bindegewebe begrenzt (Abb. 8 u. 9). Dann wächst indessen das »Myxom«-Gewebe nicht weiter in das umgebende Parenchym ein, sondern das »Aneurysma« wird zu einem Bindegewebsknoten (Abb. 10) umgewandelt, in welchem man Reste der Arterienwandung unterscheiden kann. Im Innern des bindegewebigen Knotens sieht man auch mehr oder minder zahlreiche, unregelmässig geformte Hohlräume, die bis zu einem gewissen Grade an Rekanalisationslumina erinnern, aber nicht wie solche mit einer dünnen, ebenmässigen Endothelschicht, sondern mit protoplasmareichen Zellsynzytien von wechselnder Dicke ausgekleidet sind (Abb. 11),

offenbar einem Rest des Zellbestandes in der Geschwulst-embolie.

Erörterung der Pathogenese.

Bei der Deutung dieser Gebilde machten sich, wie in der Einleitung angegeben worden ist, zwei Ansichten geltend: dass es sich um eine eigenartige Form von organisiertem Thrombus handle und dass die Gebilde Myxome seien. Die erstere Anschauung gründet sich hauptsächlich auf die Tatsache, dass das Gebilde wie eine alternde Thrombenmasse ein Gemenge von Fibrin und roten Blutkörperchen enthält, und dass die zelluläre Komponente solchen gefässbildenden jungen Fibroblasten ähnelt, wie sie bei einem Organisationsprozess in das zu organisierende Medium eindringen. Die Vertreter der zweiten Ansicht stützen sich in erster Linie auf den Umstand, dass die hyaline Zwischensubstanz bei Färbung mit Muzikarmin oder Thionin sog. »positive Schleimreaktion« gibt. Diese Autoren deuten die strangförmigen Zellsynzytien als kapillare Gefässe der Geschwulst und die augenscheinlich verstreuten Ausläufer der Stränge als die eigentlichen Geschwulstzellen. Eine Reihe weiterer Argumente für die eine oder andere Anschauung glaube ich hier unter Hinweis auf Arbeiten von u. a. *Bergstrand*, *Husten*, *Fabris* und *Eck*, wo diese Streitfrage behandelt wird, übergehen zu können.

M. E. ist nicht daran zu zweifeln, dass die zelluläre Komponente, wie die Anhänger der Thrombenorganisationstheorie betonen, eine sehr grosse Ähnlichkeit mit den mesenchymalen Zellen in einem ganz jungen Granulationsgewebe hat. Die synzytialen, sich knospenartig verzweigenden Zellstränge, die Befähigung der Zwischensubstanz zu äusserst feinkörniger Silberpräzipitation, die angedeutete Fuchsinophilie derselben in der Nähe der Zellstränge, all das sind Erscheinungen, welche sich etwa am 4. Tage bei einer aseptischen Wundheilung beobachten lassen. Dazu kommt noch eine Ähnlichkeit, welche auf Grund der neuesten Errungenschaften histologischer Forschung angezogen werden kann. *Sylvén* hat nämlich nachge-

wiesen, dass die interzelluläre Substanz im Frühstadium eines Organisationsprozesses stets freie Esterschwefelsäuren enthält, welche bei Toluidinblaufärbung Metachromasie geben. In meinem Fall gab die Zwischensubstanz bei Verwendung einer alkoholhaltigen Toluidinblaulösung eine solche Metachromasie, woraus ersichtlich wird, dass dieselbe freie Esterschwefelsäuren enthält. Hierauf beruht wahrscheinlich die von einer Reihe anderer Autoren nachgewiesene »positive Schleimreaktion« mit Muzikarmin, obwohl letztere Reaktion nicht für Esterschwefelsäuren spezifisch ist. Man kann also sagen, dass die »positive Schleimreaktion« in den sog. Endokardmyxomen eine Bekräftigung dafür darstellt, dass die Zellen in diesen Gebilden Äquivalente derjenigen jungen mesenchymalen Zellen sind, welche im Beginn einer Granulationsgewebsneubildung auftreten.

Es gibt jedoch trotz dessen mehrere Gründe, welche dagegen sprechen, dass diese sog. Endokardmyxome Organisationsprozesse sind. Erstens richtet sich die Proliferation der synzytialen Zellen nicht gegen die in dem Gebilde enthaltene Thrombenmasse, sondern dieselbe geht planlos vor sich, oder eher in Richtung vom Thrombenskelett nach der Peripherie. Ferner vermisst man die den Mesenchymzellen auf dem Fusse folgende Invasion hämatogener Wanderzellen, welche kennzeichnend für ein Granulationsgewebe ist. Schliesslich ist der Zellpolymorphismus grösser als bei einem gewöhnlichen Organisationsprozess.

Es existieren statt dessen mehr Gründe dafür, diese Gebilde mit einem anderen Vorgang zu vergleichen, nämlich mit einer *Gewebskultur von Fibroblasten*. Die Ähnlichkeit ist besonders gross mit Bezug auf die von *Parker* beschriebene »Dauerzüchtung« von Fibroblasten, bei welcher man durch Verwendung eines heparinisierten Nährbodens die Kultur dazu bringen kann, lange ohne Abstich weiterzuleben. Unter diesen Bedingungen tritt bei den Fibroblasten eine ausgeprägte Tendenz zur Synzytiumbildung und Ausformung riesenzellenähnlicher Plasmodien, Ausbildung kapillarenähnlicher Stränge

und überhaupt ein grösserer Zellpolymorphismus auf, als in einer gewöhnlichen Kultur.

Denkt man sich also das sog. Endokardmyxom als eine *Gewebskultur in vivo*, so würde der Mechanismus bei der Ausgestaltung desselben folgender sein: vom Endokard aus geht an einer begrenzten Stelle ein Hervorwuchern junger, niedrig-differenzierter mesenchymaler Zellen vor sich, welche sich durch die Gerinnung des Plasmas des Herzblutes einen Nährboden schaffen. Wenn diese »Gewebskultur« in das Lumen des Vorhofs vorrückt, werden Blutmassen eingefangen und umschlossen, welche eine Koagulationsthrombose durchmachen. Diese Thrombenmassen bilden ein Gerüst, welches wächst und der »Kultur« bei ihrer weiteren Entwicklung einen Halt gibt. Schliesslich kommt an der ursprünglichen Proliferationsbasis ein gewöhnlicher, von der Herzwand ausgehender Organisationsprozess zustande, wobei der fibröse Stiel des Gebildes entsteht. Bei dieser sekundären Organisation ist jedoch die »Angriffsfront« eine so schmale, dass eine ausgedehntere bindegewebige Umwandlung des baumförmigen zentralen Thrombengerüsts nicht erfolgt.

Eine wichtige Frage ist, ob diese Zellen, welche also wie eine Gewebeskultur in das Herzlumen einwachsen, Geschwulstcharakter haben oder nicht. In diesem Zusammenhang sind die von mir nachgewiesenen Verhältnisse bei den arteriellen Embolien zu beachten. Es zeigt sich ja, dass die Embolienmassen anfangs ein fortgesetztes selbständiges Wachstum aufweisen, nach einiger Zeit aber zu wachsen aufhören und in eine Bindegewebsmasse umgewandelt werden. Das ein bei der Embolisierung in einen neuen Abschnitt der Blutbahn überpflanztes Stück der »Gewebskultur« zunächst weiterwächst, ist selbstverständlich und spricht nicht notwendigerweise für einen Geschwulstcharakter der Zellen. Dass das Wachstum später aufhört, beruht meiner Ansicht nach darauf, dass bei der Embolisierung der Blutstrom abgebrochen und die »Kultur« damit der Möglichkeit beraubt wird, die zum weiteren Wachstum notwendigen Nährstoffe aus dem strömenden Blut zu entnehmen. Diese Zellen würden demnach ihre selbständige

Proliferation nur in engem Kontakt mit dem strömenden Blut aufrechterhalten können. Ein derartiges Verhalten spricht m. E. gegen die Annahme, dass dieselben geschwulstartig sind.

Es sind indessen in den Embolien Bilder beobachtet worden, die darauf hindeuten, dass die betreffenden Zellen innere Schichten der Arterienwandung zerstören, Bilder, welche einer geschwulstigen Destruktion sehr ähnlich sind. Aus diesem Grunde ist es schwer, bestimmt zu bestreiten, dass die Zellen Geschwulstcharakter hätten. Wenn man die Annahme akzeptiert, dass diese Gebilde mit einer Gewebeskultur vergleichbar sind, brauchen jedoch die Bilder der Gefässwanddestruktion nicht eine Geschwulstnatur der Zellen anzuzeigen. Man weiss nämlich, dass die wachsenden Zellen auch in einer Kultur von nicht geschwulstartigen solchen ein anderes, in die Kultur eingebrachtes Gewebe aufzulösen imstande sind, wenn letzteres eine herabgesetzte Lebensfähigkeit hat. Es ist daher denkbar, dass die Vitalität der Arterienwände durch die embolische Zirkulationsstörung vermindert worden war, so dass dieselben von der wuchernden Embolienmasse aufgelöst werden, obgleich die Zellen derselben keinen Geschwulstcharakter besitzen.

Woher stammen die Zellen, welche diese Gebilde aufbauen? Ein Studium des Ansatzstiels des »Myxoms« ergibt, dass die subendokardiale elastische Membran der Herzwand ohne Abbruch unter der Stielbasis entlanggeht, weshalb man annehmen kann, dass die Zellen aus dem Endokard stammen. Der Umstand, dass diese Gebilde stets vom Vorhof und besonders oft vom Septum, also von einem Gebiet mit komplizierter embryonaler Entwicklung, ausgehen, kann andeuten, dass es sich um aus dem Embryonalleben zurückgebliebene Zellen handelt.

Als Endresultat dieser Analyse der sog. Endokardmyxome will ich als meine Auffassung anführen, dass *diese Gebilde durch eine Proliferation von aus dem Endokard stammenden, vielleicht embryonalen Mesenchymzellen entstehen. Diese Wucherung ist jedoch nicht sekundär zu einem Thrombus und zur Organisation desselben bestimmt, sondern stellt allem Anschein nach eine primäre, am ehesten mit einer Gewebeskultur im Herzblut vergleichbare Proliferation dar.*

Die Zellen haben wahrscheinlich nicht den Charakter von Geschwulstzellen, wenn sich das auch nicht mit Bestimmtheit ausschliessen lässt. Dieser Prozess scheint eine in ihrer Art einzige Erscheinung zu sein, und irgendein anderer pathologischer Vorgang, welcher demselben völlig gleich wäre, existiert meines Wissens nicht. Es gibt jedoch einigermassen ähnliche Prozesse im Bereich des Gefässystems. In erster Linie ist hier der von *Masson* beschriebene Proliferationsprozess in Gefässen infizierter Hämorrhoidalknoten zu erwähnen, welchen M. für tumorartig hält und als »Hemangioendothéliome végétant intravasculaire« bezeichnet. *Henschen* hat denselben Prozess in einer grösseren Anzahl von Geweben und Organen mit entzündlichen Veränderungen und dilatierten Gefässen gefunden. Er weist darauf hin, dass der Prozess offensichtlich entzündlich bedingt ist und schlägt die Bezeichnung »Endovasculite proliferante thrombopoiétique« vor. Es handelt sich hierbei um eine Proliferation endothelähnlicher Zellen in das Gefässlumen hinein, welche bei ihrem Hervorwachsen kleine Klümpchen einer hyalinen, wie Fibrin färbbaren Masse umschliessen, welche offenbar von Blutbestandteilen gebildet wird.

Zusammenfassung.

Verf. berichtet über einen Fall von sog. Myxoma endocardii, einem gestielten, papillären, geschwulstähnlichen Gebilde im linken Vorhof, welches aus dem Septum am Foramen ovale herausragte. Das Gebilde hatte zur Entstehung multipler Embolien im Gehirn und verschiedenen Bauchorganen Anlass gegeben. Der Fall ist der erste veröffentlichte, bei dem Arterienembolien verschiedenen Alters Gegenstand mikroskopischer Untersuchung geworden sind, und wo man also konstatieren konnte, wie sich das embolische Gewebe in der Folge verhält. Es zeigt sich, dass dasselbe zunächst fortfährt, selbständig weiterzuwachsen. Die Intima und Media der Arterien

werden hierbei zerstört, und es entsteht eine Art von mit Blut und »Myxom«-Gewebe gefülltem Aneurysma dissecans. In der Folgezeit findet indessen kein weiteres Wachstum in das umgebende Gewebe hinein statt, sondern die embolisierende Masse verliert ihre Wachstumsfähigkeit, und die Aneurysmagebilde werden bindegewebig umgewandelt.

Über den Charakter dieser Gebilde wurden bisher zwei einander widersprechende Anschauungen geltend gemacht, nämlich dass sie auf eigenartige Weise organisierte Thromben wären, und dass sie echte Geschwülste, Myxome, seien. Die pathogenetische Auffassung, zu der Verf. auf der Grundlage seiner Analyse gelangt ist, weicht von beiden vorerwähnten Deutungen ab. Verf. glaubt, dass es sich um eine selbständige — also nicht von Thrombenbildung veranlasste — Proliferation aus dem Endokard stammender wenig differenzierter Zellen handelt. Hand in Hand mit dem synzytialen Einwachsen dieser Zellen in den Herzraum schaffen dieselben sich einen Nährboden aus dem Blutplasma. Man kann den Prozess mit einer Gewebeskultur von Fibroblasten *in vivo* vergleichen. Diese baumförmig hervorwachsende »Gewebeskultur« bildet sich ausserdem Schritt für Schritt ein Gerüst aus Thrombenmasse, indem grössere Blutmassen eingeschlossen werden und eine Koagulationsthrombose durchmachen. Die Frage, ob die so wuchernden Zellen geschwulstartig sind oder nicht, lässt sich schwer bestimmt beantworten. Sie weisen freilich zunächst, wenn sie bei der Embolisierung in die Arterienbahn überpflanzt werden, ein fortgesetztes selbständiges Wachstum auf, aber das Wachsen hört auf, wenn dem »Transplantat« später nicht länger frei strömendes Blut zur Verfügung steht, was nicht für den Geschwulstcharakter derselben spricht. Die Arterienwandungen werden zwar in einem gewissen Umfang zerstört, während die Embolimasse noch wächst, aber Verf. findet nicht, dass diese Erscheinung die Geschwulstnatur der Zellen mit Sicherheit anzeigt.

Die sog. Endokardmyxome sind also nach Verf.s Ansicht weder organisierte Thromben noch Geschwülste derselben Art

wie die vom Bindegewebe ausgehenden Myxome, sondern eine einzigartige Proliferation mesenchymaler Zellen, welche in einem Milieu von strömendem Blut vor sich geht und am ehesten mit einer Gewebskultur in vivo vergleichbar ist.

SCHRIFTTUM.

- Abrahamer, I.*: Myxomatöse Bildungen an den Herzklappen beim Neugeborenen. Zbl. f. Gynäkol. 55, 2344, 1931.
- Ambrosius*: Inaug. Diss., Frankfurt 1919.
- Bacaloglu, C., Ilescu, C. & Raileanu, C.*: Les thrombus myxoides du coeur. Presse méd. 41, 2074, 1933.
- Baemcister*: Zur Kasuistik d. prim. Herzgeschwülste. Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 17, 257, 1906.
- v. Bamberger*: Myxomatöse Geschwulst im linken Vorhof. Wiener Med. W.schr. 1872.
- Bennet, D. W., Konigsberg, J. & Dublin, W.*: Primary tumor of the heart, etc. Am. Heart J. 16, 117, 1938.
- Bergstrand, H.*: Beitrag z. Path. d. prim. Tum. d. Herzens. Virch. Arch. 224, 225, 1917.
- Berthensen, L.*: Zur Frage von d. Diagnose primärer Neoplasmen d. Herzens. Virch. Arch. 132, 1893, u. Arch. internat. méd. expér. 5, 386, 1893.
- Bien, C. W. & Ch'in, K. Y.*: Myxoma of heart. Chinese M. J. (Suppl.) S. 64, Febr. 1936.
- Binder, A.*: Zur Frage der Endocardtumoren. Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path. 77, 332, 1927.
- Blochmann*: Ein Fall v. Myxom d. linken Vorhofs. Inaug. Diss. Kiel 1904.
- Blumgart*: Am. J. Med. sc. 134, 576, 1907.
- Bolle, W.*: Arch. f. wissenschaft. u. prakt. Tierh. 59, 451, 1929.
- Bostroem*: Primäres Myxom d. linken Vorhofs. Sitzungsbericht d. Erlanger phys.-med. Ges. 1880.
- Branch, C. F.*: Primary neoplasm of heart valve. Am. J. Path. 7, 157, 1931.
- Brenner*: Das Hämangioelastomyxoma cordis, etc. Frankf. Zschr. f. Path. 1, 492, 1907.
- Brodowsky*: zit. n. Mandelstamm.
- Burns*: Diseases of the heart, 1813 (zit. n. Husten).
- Chiari, H.*: Myxom des rechten Vorhofs, etc. Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 52, 241, 1931.

- Choisy*: Polype du coeur. Bull. de la Soc. anat. de Paris 8, 65, 1833.
- Cilotti, M.*: Sui cosi detti tumori papillari delle valvole cardiache. *Pathologica* 21, 613, 1929.
- Clerc, A., Gauthier-Villars, P., Delamare, J. & Rogé*: Arch. d. mal. du coeur 30, 361, 1937.
- Czemes*: Magyar orv. Arch. 15. Ref.: Zbl. f. Herz u. Gefässkrh. 17, 304, 1925.
- Dean, C. & Falconer, A. W.*: Primary tumors of the valves of the heart. *Journ. of Path. & Bact.* 18, 64, 1913.
- Eck, H.*: Zur Frage d. prim. gutartigen Endocartumoren. *Beitr. z. path. Anat. & allg. Path.* 102, 554, 1939.
- Eimer*: Dtsch. Arch. klin. Med. 159, 164, 1928.
- Escher*: Z. Kenntn. d. prim. Geschw. d. Herzens. Inaug. Diss. München 1909.
- Fabris, A.*: Fibro-angio-myxomatöse Neubildung des Herzens. *Virch. Arch.* 241, 59, 1923.
- Fawcett, R. E. M. & Ward, E. M.*: *Brit. Heart J.* 1, 249, 1939.
- Feller*: Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 47, 145, 1930 und Sitz. d. Verein. path. Anat. Wiens am 29. 4. 1929.
- Forel*: *Internat. Clin.* 4, 147, 1919.
- Fossel, M.*: Beitr. z. Kenntnis d. prim. Herzgeschwülste. *Frankfurter Zschr. f. Path.* 49, 355, 1936.
- Galassi*: *Pathologica* 1915 (zit. n. Cilotti).
- Gilchrist, A. R. & Millar, W. G.*: Paroxysmal auricular tachycardia associated with a primary cardiac tumour. *Edinburgh M. J.* 43, 243, 1936.
- Gorlitz, W.*: Myxom des Herzens mit multiplen GehirneMBOLIEN. *Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat.* 61, 115, 1934.
- Grillo, V.*: Su di un voluminoso fibromixoma dell'endocardio. *Pathologica* 24, 405, 1932.
- Guldberg, G.*: Primaer svulst i endokardiet. *Norsk Mag. f. Laegevid.* 89, 272, 1928.
- Hagedorn*: Über prim. Herztum. *Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat.* 19, 825, 1908.
- Henschen, F.*: L'endovasculite proliferante thrombopoïétique. *Ann. d'anat. path.* 9, 113, 1932.
- Hewer, T. F. & Kemp, R. P.*: *J. Path. & Bact.* 43, 511, 1936.
- Hiess, W.*: Ein Fall von sogen. Myxom d. Herzens. *Frankf. Zschr. f. Path.* 4, 214, 1910.
- Hirsch*: Inaug. Diss. Königsberg 1911 (zit. n. Mandelstamm).
- Hlava*: zit. n. Mandelstamm.
- Houck, G. H. & Bennett, G. A.*: Polypoid fibroma of the left auricle (so called cardiac myxoma) causing a ball-valve action. *Am. Heart J.* 5, 787, 1930.

- Husten, K.*: Über Tumoren und Pseudotumoren des Endocards. Beitr. z. path. Anat. u. allg. Path. 71, 132, 1923.
- Jacobsthal, H.*: Primäres Fibromyxom d. linken Vorhofes. Virch. Arch. 159, 351, 1900.
- Jaffé*: Beitr. z. path. Anat. u. allg. Path. 64, 533, 1917.
- Jäger*: Beitr. z. Kenntn. d. prim. Herzgeschwülste. Inaug. Diss. München 1893.
- Jacobson*: Beitr. z. d. prim. Geschw. d. Herzens. Inaug. Diss. Königsberg 1911.
- Jaleski, T. C.*: Myxoma of heart valves. Am. J. Path. 10, 399, 1934.
- Jellinek*: Zwei Fäll v. Myxom d. Herzens. Inaug. Diss. Heidelberg 1918.
- Jensen, C. R.*: North-west. Med. 33, 394, 1934.
- Jürgens*: Zur Kasuistik d. prim. Herzgeschwülste. Berl. klin. W.schr. S. 42, 1891.
- Kalbfleisch, H. H.*: Weisse Hirnerweichung durch GewebseMBOLUS aus einem sogenannten Myxom des linken Herzvorhofes. Zsch. f. Kreislauforsch. 30, 625, 1938.
- Karrenstein*: Ein Fall v. Fibroelastomyxom d. Herzens, etc. Virch. Arch. 194, 127, 1908.
- Koester*: Braune Indur., u. s. w. Virch. Arch. 55, 455, 1872.
- Kornfeld, M.*: Zottengeschw. d. Pulmonalklappe. Virch. Arch. 270, 873, 1928.
- Laubry, C., Soulié, P. & Dugas, J.*: Thrombose auriculaire gauche primitive à forme pseudo-tumorale. Arch. d. mal. du coeur. 30, 481, 1937.
- Leonhart, A.*: Über Myxome d. Herzens, insbes. d. Herzklappen. Virch. Arch. 181, 347, 1905.
- Lorne*: Myxome du coeur. Bull. de la soc. anat. de Paris, S. 161, 1869.
- Louria*: A polypoid myxoma of the heart. Stud. from Path. Dep. Columbia Univ. Vol. 17, 1920.
- Ludwig, H.*: Funktionelle Mitralstenosen durch Tumoren d. linken Vorhofs. Zsch. f. klin. Med. 123, 587, 1933.
- Lymburner*: Canad. M. A. J. 30, 368, 1934.
- Magnusson, H.*: Zsch. f. Krebsforsch. 15, 212, 1915.
- Mandelstamm, M.*: Über primäre Neubildungen d. Herzens. Virch. Arch. 245, 43, 1923.
- Marchand*: Zur Kenntn. d. Emboli u. Thrombose d. Gehirnant., zugleich ein Beitr. z. Kasuistik d. prim. Herzgeschwülste. Berl. klin. W.schr. 31, 1, 1894.
- Martin, W. C., Tuohy, E. L. & Will, C.*: Primary tumor of the heart. Am. Heart J. 17, 728, 1939.
- Martinotti*: Contribuz. allo studio di tumori del cuore. Gaz. d. clin. 1886.

- Masshoff, W.*: Beitr. z. Myxombildung im Herzen. Inaug. Diss. Leipzig 1935.
- Masson*: Bull. et Mém. Soc. Anat. de Paris 20, 517, 1923.
- Meröz*: Les tum. prim. du coeur. Inaug. Diss. Genf. 1911.
- Montaldo, G.*: Arch. ital. di anat. e istol. pat. 6, 313, 1935.
- Mossdorf*: Zschr. f. Veterinärk. 42, 409, 1930.
- Müller, W.*: Virch. Arch. 284, 105, 1932.
- Norton, W. H.*: Myxoma of the heart, simulating bronchopneumonia. Am. J. M. Sc. 158, 689, 1919.
- Nowicki, W.*: Beitr. z. Anat. d. prim. Herzgeschwülste. Virch. Arch. 259, 502, 1926.
- Parker, R. C.*: Physiologische Eigenschaften mesenchymaler Zellen in vitro. Arch. f. exp. Zellforsch. 8, 340, 1929.
- The races that constitute the group of common fibroblasts. J. of exp. med. 58, 97, 1933.
- Studies on organogenesis. J. of exp. med. 60, 351, 1934.
- Petroff*: Bolnit. Gaz Botkina, Nr. 20, 1897 (zit. n. Mandelstamm).
- Raynaud, R. & Marill, F. G.*: Algérie méd. 43, 285, 1939.
- Ribbert, H.*: Über das Myxom. Frankf. Zschr. f. Path. 4, 30, 1910.
- Riopelle, J. L.*: Sur un cas de myxome du coeur avec erythropoïèse locale. Ann. d'anat. path. 14, 725, 1937.
- Robin*: Note sur un cas de myxome du coeur. Arch. de méd. exp. et d'anat. path. 5, 802, 1893.
- Saltykow*: Hämangioelastomyxom d. Herzens. Korr.-Bl. Schweiz. Ärzte. 41, 671, 1911.
- Salvioli*: Missoma teleangioectatico etc. Revista clin. di Bologna, Nr. 10, 1878.
- Schnor*: Russki Wratsch 47, 1662, 1913. (zit. n. Mandelstamm).
- Schwarz, D.*: Über die sog. Myxome d. Herzens. Virch. Arch. 264, 747, 1927.
- Socin*: Berl. klin. W.schr. 10, 265, 1916.
- Soria, E.*: Arch. ital. di anat. & istol. pat. 1, 843, 1930.
- Spangaro, C.*: Arch. ital. di anat. e istol. pat. 9, 165, 1938.
- Staffel*: Inaug. Diss. Jena 1919.
- Stahr*: Über sog. Endocardtum. u. ihre Entstehung. Virch. Arch. 199, 162, 1910.
- Strouse, S.*: Primary benign tumor of the heart of forty-three years' duration. Arch. int. med. 62, 401, 1938.
- Sylvén, B.*: Über das Vorkommen v. metachromatischer Substanz in wachsendem Gewebe u. ihre Bedeutung. Klin. W.schr. 17, 1545, 1938.
- Thompson & Atchinson*: Two cases of tum. of the left auricle. Clin. Soc. Trans. 37, 192, 1904.

- Trespe*: Z. Kenntn. d. prim. Geschw. d. Herzens. Arb. aus d. path. anat. Abt. d. kgl. Hygien. Inst. zu Posen 1901.
- Ugrumow, B.*: Über ein papillomatöses Myxom d. rechten Vorhofes. Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 41, 7, 1927.
- Wassiljeff, A. A.*: Zur Frage d. Myxome d. Herzens. Frankf. Zschr. f. Path. 40, 424, 1930.
- Weltmann*: Wiener Klin. W.schr. 25, 18, 1920.
- Windholz, F.*: Über Thromben und Geschwülste d. Herzens. Virch. Arch. 273, 331, 1929.
- Winkler*: Z. Path. d. prim. Gewächse d. Herzens. Verh. Dtsch. Path. Ges. 14 Tag. S. 362, 1910.
- Yater, W. M.*: Tumors of the heart and pericardium. Arch. int. med. 48, 627, 1931.

THE TYPE-CLASSIFICATION OF PARK WILLIAMS STRAIN NO. 8.

By *C. Tarnowski.*

(Received for publication January 8th, 1942).

The advances made in diphtheria research in recent years have shown that diphtheria bacilli are divisible into three cultural groups generally known as the *gravis*, *intermedius* and *mitis* types. The point of particular interest in this grouping is that when one examines large materials of diphtheria cases, one finds that — as the names imply — there is a relation between these cultural types and the degree of severity of the disease.

Summarising the materials of earlier investigators, Cooper, Happold, McLeod & Woodcock (7) found that among almost 6000 cases of diphtheria in eleven large towns in England, Scotland, Ireland and Germany there was a mortality for the *gravis*, *intermedius* and *mitis* groups amounting to 13.3, 8.6 and 2.3 per cent. respectively. Paresis occurred in 17.0, 9.9 and 4.5 per cent., whereas croup was found in 2.3, 1.3 and 7.5 per cent. of the cases (Table I). Accordingly, *mitis* strains are more liable to cause croup than the others (12).

Even before this classification came forward attention had been drawn to the fact that serum given at an early stage of the disease and in large doses often failed to give the expected effect.

The cases of clinical diphtheria occurring now and then among Schick-negative and vaccinated people also show that

the gravis strains are more pathogenic than intermedius and mitis. In these cases, which progress as a rule without complications, the type is gravis almost without exception, much more rarely the intermedius type, whereas there is no mention of mitis strains as the cause of such cases. These facts furthermore make it clear that even if the type of bacillus has a bearing on the course of the infection, the position as regards immunity is of still greater importance.

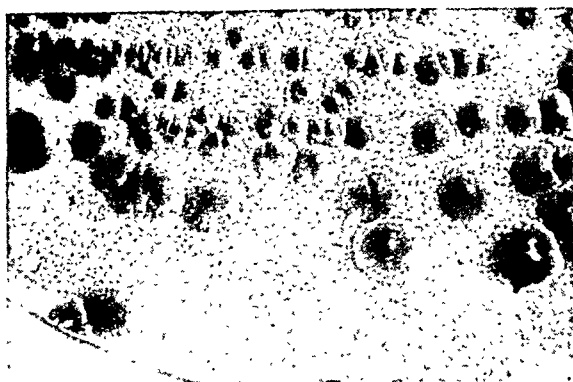
TABLE I

TYPES	NUMBER OF CASES	DEATHS	PARESIS	GROUP
GRAVIS	2313	13,3%	17,0%	2,3%
INTERMEDIUS	1993	8,6%	9,9%	1,3%
MITIS	1488	2,3%	4,5%	7,5%
RELATION BETWEEN GRAVIS, INTERMEDIUS AND MITIS TYPES AND THE PROPORTIONAL OCCURRENCE OF DEATHS, PARESIS AND GROUP. (COOPER, HAPPOLD, MCLEOD & WOODCOCK).				

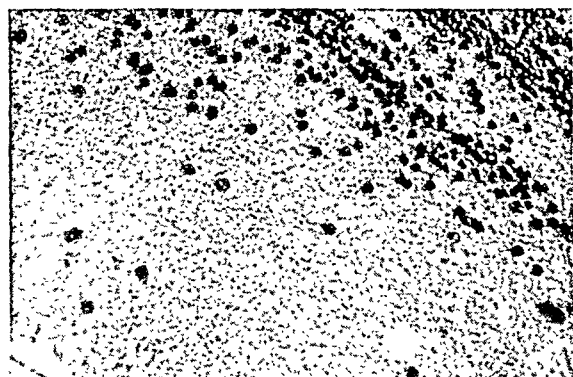
This grouping, which was described by Anderson, Happold, McLeod & Thomson in 1931 (1, 2), is based on the shape of the diphtheria bacillus colonies when they grow on a special potassic-tellurite rabbit blood agar plate (Fig. 1), their growth in broth, and differences with regard to haemolysis and ability to ferment starch and glycogen (Table III).

The cultural types vary considerably in their distribution. At some places, e. g. Berlin, gravis strains are much the more common whereas intermedius strains are rare; at other places the three types are distributed almost equally. In Denmark the intermedius strains predominate, not in Copenhagen alone but in the provinces as well.

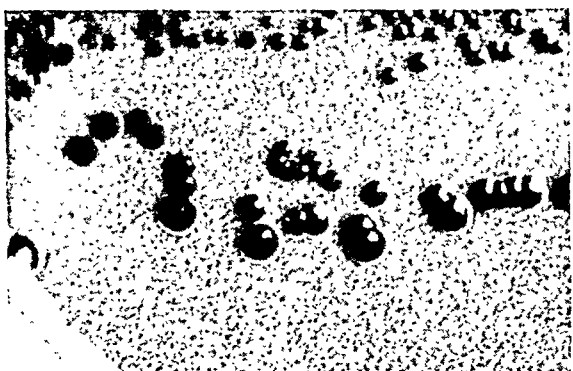
Of the 2567 diphtheria strains isolated during the past five years in the diagnosis department of this Institute, 83 per cent. were of the intermedius type, 15.6 per cent. mitis and



gravis



intermedius



mitis

Fig. 1.

TABLE III

STRAINS	N°	COLONY	GROWTH IN - BROTH	HEMOLY- SIS TEST (PLATE)	SUGAR FERMENTATION TESTS						TEST FOR PATHO- GENICITY	SERA				156 - SERUM ABSORBED WITH																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
					GLUCOSE	GALACTOSE	MALTOSE	SACCHAROSE	MANNITOL	GLYCOCEN		STARCH																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
GRAVIS (MANCHESTER)	1281	GRAVIS	PELLICLE AND GRANULAR DEPOSIT	+	+	+	+	0	0	+	+	300	0	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

^b KEPT IN SUBCULTURE FOR SEVERAL YEARS IN THIS INSTITUTE'S SERUM DEPARTMENT.

SURVEY OF THE CULTURAL AND SEROLOGICAL BEHAVIOUR OF SOME TYPICAL AND SOME STRONGLY TOXIGENIC LABORATORY STRAINS

only 1.4 per cent. gravis, 9.8 per cent. were pathogenic and 5.8 per cent. were apathogenic mitis strains.

As a result of pathogenicity tests on guinea-pigs and rabbits it transpires that the apathogenic diphtheria bacilli occur within the mitis group almost exclusively, whereas it may generally be assumed that typical gravis and intermedius strains are pathogenic.

Most investigators agree that the cultural types are stable, not only when cultivated on various ordinary nutritive media but also after animal passages and in man. Repeated swabs from isolated patients almost always give the same cultural type; this is also the rule with chains of infection in families, creches and similar institutions. When the three cultural types are grown under certain conditions, however, it is possible to segregate variants. This shows that the type properties are not equally stable. The fermentation reaction with starch and glycogen and the haemolysis reaction are more constant than the shape of the colony and the appearance of the growth in broth (3, 13, 19, 20).

Animal experiments have demonstrated the fact that the usual serum prepared with Park Williams Strain No. 8 has a curative effect on infection caused by all three cultural types if the serum treatment is initiated at a sufficiently early stage and if a suitable dose is administered. However, certain investigators have observed a greater effect on mitis than on gravis and intermedius infections (9, 16, 18) and have shown that serum gives more protection to guinea-pigs against the mitis type than against the other two (9, 14).

The usual anatoxin prepared with Park Williams Strain No. 8 protects animals against all three cultural types (16, 17, 18).

Investigators do not agree as to whether the toxins of the three types are the same or not (5, 8, 15, 18). Those who consider that these toxins are the same explain the greater pathogenicity of the gravis strains by a special property of invasion or by the theory that in the organism they form toxin more rapidly than the other types (6, 10, 18).

In culture the mitis strains in most cases form a much more potent toxin than the strains of the other two types (16, 17), but Park Williams Strains No. 8 forms the most powerful toxin (11).

A question that has remained unanswered hitherto is: To which of the cultural types does the Park Williams Strain No. 8 belong? This of course is the strain which everywhere in the world during the past forty-five years has been and still is used for preparing toxin and consequently for serum and anatoxin. It cannot be classified definitively by cultivation.

Anderson, Happold, McLeod & Thomson (1) refer it to the intermedius group, in so far as culturally it comes near to that group than to the other two types.

Robinson (19) regards it as variant mostly resembling the mitis type. H. Schmidt (21) considers that it is of the mitis type now, but that earlier it was perhaps a gravis strain. There is nothing conclusive to show that it belongs to the mitis group.

Investigation (i. a. at this Institute) shows that each of the three groups comprises several serological types which may be distinguished from one another by means of agglutination reactions. So far 9 gravis, 5 intermedius and 13 mitis types have been found (Table II). Serological research at this Institute has succeeded in demonstrating the fact that Park Williams Strain No. 8, 113, serologically is identical with a typical mitis strain, 156, received from the Robert Koch Institute in 1936. The strain was labelled »Diphtherie mitis Nr. 36753 10—10—1936«. In agglutination tests both strains react in the same manner to each other's serum and can completely exhaust them both. Furthermore, neither none of the strains reacts to 26 other type sera.

Four other strongly toxigenic strains which for several years have been preserved in cultures in this Institute's serum department, one from the Pasteur Institute and another from the Wellcome Laboratory, are agglutinated to the titer of PW₈ — and 156 — serum. These strains (Table III) are all cap-

able of completely exhausting 156 serum, and none of them reacts to the other 26 type sera.

As the 156-type has never been found in this country, whereas a certain intermedius type, 473, distinctly predominates, the question arises of whether a strain of this type should not be employed for the preparation of serum and anatoxin, perhaps in combination with PW₈, even if in Denmark it is usual to observe good effects from the serum employed compared with what happens in many places abroad.

Summary.

In Denmark a certain intermedius type is much the commonest form of diphtheria bacillus.

By means of agglutination reactions, whereby gravis, intermedius and mitis strains are divided into 9, 5 and 13 types respectively, it is shown that serologically Park Williams Strain No. 8 is identical with a typical mitis strain that has not been observed in this country.

The author moots the question of whether the commonly-occurring type — perhaps in conjunction with Park Williams Strain No. 8 — should not be employed in the preparation of serum and anatoxin.

REFERENCES.

1. *Anderson, J. S., F. C. Happold, J. W. McLeod & J. G. Thomson:* On the Existence of two Forms of Diphtheria Bacillus — *B. diphtheriæ gravis* and *B. diphtheriæ mitis* — and a New Medium for their Differentiation and for the Bacteriological Diagnosis of Diphtheria. *J. Path. & Bact.* 33: 667, 1931.
2. *Anderson, J. S., K. E. Cooper, F. C. Happold & J. W. McLeod:* Incidence and Correlation with Clinical Severity of gravis, mitis and Intermediate Types of Diphtheria Bacillus in

- a Series of 500 Cases at Leeds. *J. Path. & Bact.* 36: 169, 1933.
3. *Christison, M. H.*: The Stability of the mitis, Intermediate and gravis Types of *B. diphtheriæ*. *J. Path. & Bact.* 37: 243, 1933.
 4. *Clauberg, K. W.*: Kann die bakteriologische Typenlehre zur Erklärung der Wandlung im Erscheinungsbilde der Diphtherie herangezogen werden? *Klin. Wchnschr.* 1933; 969.
 5. — Zur Frage der Unterschiedlichkeit der Diphtheriebazillentyptoxine. *Klin. Wchnschr.* 1939 (II); 1490.
 6. *Clauberg, K. W. & R. Plenge*: Untersuchungen zur Pathogenese der Diphtherie. *Klin. Wchnschr.* 1937; 223.
 7. *Cooper, K. E., F. C. Happold, J. W. McLeod, H. E. de C. Woodcock, J. S. Anderson, W. M. Elliot, H. M. Leete, J. C. Saunders & S. H. Warren*: Review of the Observations Which Have Accumulated with Regard to the Significance of Diphtheria Types in the Last Four Years (1931—1935). *Proc. Roy. Soc. Med.* 29: 1029, 1936.
 8. *Etris, S.*: Antigenic Relation of gravis Strains of Diphtheria Bacilli as Compared with Park 8 Strain. *J. Infect. Dis.* 55: 220, 1934.
 9. *Gundel, M. & N. Erzín*: Die spezifische Therapie der Diphtherie und die Typendifferenzierung der Diphtheriebazillen. *Deutsche med. Wchnschr.* 1936 (II); 1292.
 10. — Untersuchungen zur Pathogenese der Diphtherie unter besondere Berücksichtigung der »Virulenz« der Diphtheriebazillentypen. *Zentralbl. f. Bakt.* 136: 24, 1936. Org.
 11. *Happold, F. C.*: Toxinproduction by *C. diphtheriæ* Types: mitis, gravis and intermed. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 43: 412, 1940.
 12. *McLeod, J. W., J. W. Orr & H. E. de C. Woodcock*: The Morbid Anatomy of gravis, intermedius and mitis Diphtheria. *J. Path. & Bact.* 48: 99, 1939.
 13. *Menton, J.*: The Different Forms of *Corynebacterium diphtheriæ*. *J. Path. & Bact.* 35: 651, 1932.
 14. *Murray, J. F.*: The Relative Pathogenicity for the Rabbit of gravis, mitis and Intermediate Strains of *C. diphtheriæ*. *Brit. J. Exper. Path.* 46: 384, 1935.
 15. *O'Meara, R. A. Q.*: *Corynebacterium diphtheriæ* and the Composition of its Toxin in Relation to the Severity of Diphtheria. *J. Path. & Bact.* 51: 317, 1940.
 16. *Parish, H. J., E. E. Whatley & R. A. O'Brien*: *B. diphtheriæ*, gravis and mitis. *Brit. M. J.* 1932; 915.
 17. — *B. diphtheriæ*, Gravis and Mitis. *J. Path. & Bact.* 35: 653, 1932.

18. *Povitzky, O., M. Eisner & E. Jackson*: Effectiveness of Standard Diphtheria Antitoxin against all Types of Diphtheria Infection. *J. Infect. Dis.* 52: 246, 1933.
19. *Robinson, D. T.*: Further Investigations on the gravis, mitis and »Intermediate« Types of *C. diphtheriæ*: Type Stability. *J. Path.* 39: 551, 1934.
20. *Robinson, D. T. & A. L. P. Peeney*: The Serological Types amongst Gravis Strains of *C. diphtheriæ* and their Distribution. *J. Path. & Bact.* 43: 403, 1936.
21. *Schmidt, H.*: Grundlagen der spezifischen Therapie und Prophylaxe bakterieller Infektionskrankheiten. Berlin—Grunewald: Schultz, 1940, p. 431.

DANSK PATOLOGFORENINGS 3. MØDE 24/11 1941
I KØBENHAVN.

*The third Meeting of the Danish Pathological Society,
November 24, 1941.*

Troisième séance des pathologistes danois le 24 novembre 1941.

Dritte, dänische Pathologentagung am 24. November 1941.

N. O. Christensen and Hans Roth: *On parasitic gastritis in the horse, due to Trichostrongylus axei* (Cobb. 1879) Railliet et Henry 1909.

Trichostrongylus axei, a minute nematode of a few millimeters' length, was by us found to be a very common and not infrequently harmful parasite of the fourth stomach of sheep, and sometimes also of cattle, in Denmark. Since this worm is known to be the only parasite occurring in both ruminants and horses, a systematical examination was made of the stomachs of horses which had died at the Medical Clinic of the Royal Veterinary College. Hitherto 69 stomachs have been examined. *Trichostrongylus axei* was found in 26 cases or 37.7 per cent, *Habronema* spp. (i. e. *H. muscae* or *H. microstoma*), another nematode genus, in 31 cases or 45 per cent, and larvae of *Gastrophilus* spp., the horse bot-flies, in 50 cases or 72.5 per cent. Moreover, *Ostertagia ostertagi*, another stomach worm of cattle, was three times met with, for the first time in the horse. The presence of *T. axei* was in almost all cases followed by very characteristic pathological processes in the mucosa of the glandular portion of the stomach, while *Habronema* spp. apparently only give rise to unspecific hypertrophy and abundant production of mucus, and *Gastrophilus* spp. cause the well-known lesions in the oesophageal portion of the stomach. The typical changes due to *T. axei* consist of localized and more or less strictly circumscribed thickenings of the mucosa, which are often of a paler colour than the surroundings. Sometimes the center of the round processes seems to be depressed so that the walls alone remain elevated, thus presenting a »ring-

wormlike« picture. Scrapings from the typical processes mostly contain both worms and free eggs. The extent of these changes is in fairly good correlation to the number of worms found in the stomach. In cases of heavy invasion, the processes are more confluent, resulting in a »maplike« aspect particularly along the »margo plicatus«, and there is general hypertrophy and often hyperaemia of the mucosa as well as abundant production of viscous mucus. — Microscopical examination reveals increase in the number and size of cells of the surface epithelium, and between the gastric glands is seen hyperaemia, round cell infiltration (in a few cases eosinophils) and, sometimes, hypertrophy of interstitial connective tissue. Sections of worms and eggs are often seen to be deeply embedded in the gastric pits and in the lumina of the glands. In a few cases small processes, typical both macro- and microscopically, were found without any worms or eggs being detected in the stomach. — The present material of horses which had succumbed to different diseases does not permit of drawing conclusions as to the clinical significance of the lesions due to this parasite. Some clinical, and even fatal, cases have been reported by other authors, however. For the present, it must at any rate be emphasized that horses may serve as carriers of the infection to ruminants, and attention is drawn to earlier reports suggesting that also human beings may possibly be infected with the parasite.

Discussion:

A. Nyfeldt asked if the authors had seen changes in the blood picture, especially eosinophilia.

N. O. Christensen: In the literature we have found descriptions of cases with pronounced blood eosinophilia. As our investigations were performed on a postmortem material, we can say but little about this question. However, in one case or two, where infestation with *T. axei* was suspected during life, we carried out a hematological examination but did not find any increase of the percentage of eosinophil granulocytes, although our suspicion was confirmed by autopsy.

The work will be published later in extenso.

Aage Jepsen: *A case of listerella infection in lambs. Will be published in extenso in Acta path. et microbiologica scand.*

A. Nyfeldt thanks for the interesting report. Twelve years have elapsed since N. found listerella in Man. Congratulates Professor Jepsen on his having succeeded in demonstrating listerella. By many authors the bacterium is considered to be a hemolytic streptococcus, which it actually resembles.

Harald Gormsen: *Über den Nachweis von Tumorzellen in Sternalpunktaten.* (Zusammenfassung).

Bei einem Material von 311 Sternalpunktaten von 263 Patienten mit malignen Tumoren (21 Patienten mit Sarkomen, 14 mit Retikulumsarkomen, 14 mit Lymphosarkomen, 16 mit multiplen Myelomen und 198 mit Carcinomen) enthielten im ganzen 56 Punktate Geschwulstzellen, so dass 18 % von allen Punktaten diagnostische Schlussfolgerungen zuließen.

Von den Sarkom-Patienten (4 Patienten mit osteogenen Sarkomen, 6 mit Ewingsarkomen und 11 mit verschiedenen Formen von Weichteilsarkomen) wies nur 1 Tumorzellen im Sternalpunktat auf (ein Patient mit Sarcoma pulmonis und röntgenologisch festgestellten Knochenmetastasen).

Die Sternalpunktate von Patienten mit Retikulumsarkomen enthielten in keinem Falle Geschwulstzellen, während die Sternalpunktate von 2 Patienten mit Lymphosarkomen eine recht bedeutende Infiltration des Knochenmarks mit lymphatischen Elementen aufwiesen.

Von den 16 Myelompatienten hatten 14 zahlreiche Myelomzellen im Sternalpunktat, aber 2 Patienten wiesen ein normales Sternalpunktat auf, obwohl die Diagnose Myelomatose durch Biopsie an anderen Stellen des Skelettes verifiziert war.

Von den 198 Patienten mit Carcinomen hatten 28 = 14 % Geschwulstzellen im Sternalpunktat (2 Patienten mit C. pulmonis, 1 mit Teratoma malignum testis, 5 mit Prostata-c., 1 mit Knochenmetastasen von occultum Primärtumor und 19 mit C. mammae).

Von den 198 Carcinom-Patienten hatten 55 röntgenologisch nachweisbare Knochenmetastasen. 21 von den 28 Punktaten, die Tumorzellen enthielten, stammten von Patienten mit röntgenologisch festgestellten Knochenmetastasen, 7 Punktate stammten von Patienten ohne röntgenologische Anzeichen von Knochenmetastasen, von dieser 7 Patienten bekamen aber jedenfalls 3 später Knochenmetastasen.

Bei 36 % der Carcinompatienten *mit* und bei 5 % der Carcinompatienten *ohne* röntgenologische Anzeichen von Knochenmetastasen wurden demnach Geschwulstzellen in den Sternalpunktaten gefunden.

Es wird hervorgehoben, dass man, wenn man den Verdacht auf Knochenmetastasen hegt, das Vorhandensein von solchen in einigen Fällen mit Hilfe von Sternalpunktion nachweisen kann, bevor röntgenologische Anzeichen davon oder wenn suspekter Röntgenbilder vorliegen und dass, wenn im Sternalpunktat von Cancerpatienten Tumorzellen nachgewiesen worden sind, die Strahlen-

behandlung einem sonst beabsichtigten chirurgischen Eingriff meistens vorgezogen wird.

Diskussion:

J. Engelbreth-Holm lenkt die Aufmerksamkeit darauf, dass die Beobachtung wesentliche Bedeutung erlangen wird insofern, als sie unsere bisherige Metastasenauffassung verändern wird. Es ist »Geschwulstzellen-aemie« vorhanden, d. h. die meisten Tumorpatienten haben Geschwulstzellen im Blute, die Mehrzahl ihrer Zellen kommt aber nie dazu, Metastasen zu entwickeln. Engelbreth-Holm verspricht sich sehr viel von den Nachuntersuchungen.

J. Ørskov dankt und pflichtet Engelbreth-Holm bei.

Lorentz Heerup: »*Eosinophilic Leukemia*« and »*Eosinophilia Leukemoides*«.

A boy aged 7 was admitted to hospital after 14 days of illness (headache, fever, some stiffness in the neck, varying pains in the kneejoints). Besides the ordinary children's diseases he had had scarlet fever and, during the last years, several attacks of middle ear suppuration. On admission the spinal fluid was normal, and the blood count showed 3,6 millions r. b. c. and 101,200 w. b. c. with 78 % of eosinophilic cells of an apparently mature type, but still with some deviations from the norm (larger size, more abundant, basophilic cytoplasm, variability in size, number and distribution of the granules). The nuclei made a mature impression, but showed transitional forms from round nucleus to ringshaped nucleus which, when broken apparently gave rise to two- or three-lobed nuclei. Only 1,5 % myelocytes, no myeloblasts; neutrophiles 15 %, lymphocytes 4 %, monocytes 2,5 %. Bone-marrow from sternum (intravital) was very cellular with enormous increase of eos. cells, especially lobulated forms; only 1,5 % of myoblasts and, altogether, 12,3 % of myelocytic forms. No enlargement of liver, spleen, or lymphatic glands. No parasite eggs were found in the faeces. During the hospital stay the leukocyte count varied from 50 to 165,000. Under increasing dyspnoea and cyanosis the boy died, 11 weeks after the onset of symptoms, without any changes in the blood picture.

Autopsy disclosed rather indurated, great cyanoticbrown mottled lungs without pneumonia. The heart was hypertrophied and dilated with a smaller parietal thrombus in the apex of the right ventricle and a great, thick parietal thrombus covering the greater

part of the inner surface of the left ventricle. The myocard showed great scarred areas, but the greater branches of the coronary vessels were patent. The spleen was enlarged, 170 gr. without visible leukemic infiltrates. The liver was of normal size without leukemic infiltrates. The lymphatic nodes were moderately enlarged. Bone-marrow (sternum, femur, vertebra) dark red, cellular. No real leukemic infiltrates were seen in any organs.

Microscopical examination revealed changes in the lungs similar to those seen in anaphylactic shock in animal experiments (hyaline thrombi, homogenized erythrocyte thrombi, oedema, »fibrinoide Verquellung« in the vascular walls and eos. infiltration). The heart showed obliterating processes in the smaller coronary branches of the same type as is seen in clinical and experimental allergic endarteritis obliterans with scarring and consecutive parietal thrombosis. The follicular structure of the spleen and lymphatic glands was preserved, not destroyed as in leukemia, and the tissue was crowded with eos. cells. Nowhere in the organs including the liver and the kidneys were actively proliferating myeloid foci seen. The bone-marrow showed an enormous increase of eos. cells, but most of them were of the apparently »mature« type even if early stages could be seen, but nowhere presenting the picture of immaturity and proliferation as in leukemias in general.

A study of clinical and experimental work on allergic changes and on the origin of the eos. cells is presented and compared with the findings in the reported case, — indicating a constant stimulation of the production of eos. cells on an allergic basis (originally by sensibilization from the repeated middle ear suppurations and continued by auto-sensibilization with allergenic products from the pathologic processes in heart and lungs).

A critical analysis of the hitherto reported 13 cases of co-called »eosinophilic leukemia«, where autopsies and microscopical examinations were performed, shows that in no less than 5 of these cases similar parietal thrombi were found, and that severe myocardial changes were seen in further 3 cases. All the authors agree about the »maturity« of the eos. cells found in the blood. Only in two cases real macro- and microscopical leukemic changes were seen accompanied by a myeloblastic turn in the blood picture (Stephens; Plum and Thomsen). None of the other cases presented real leukemic changes either in the blood picture or in the organs, though a slight myeloblastic activity in the bone-marrow or elsewhere was seen in some cases.

The author therefore ventures to set forth the theory that, besides rarer cases of real eosinophilic leukemia with partial or total transition to myeloblastic leukemia and with real leukemic changes

in the organs, cases which, clinically can hardly be differentiated from the former, are of much more frequent occurrence in these cases, to which the reported case belongs, neither distinct leukemic immaturity of the blood picture nor real leukemic, actively proliferating infiltrates in the organs are found. This disease should rather be called »eosinophilia leukemoides«, and it may depend upon endo- or exogenous allergenic processes, causing a constant irritative stimulus with hyperproduction of eos. cells of »mature« but not yet fully developed type.

Discussion:

A. Nyfeldt inquires about the proportion of the erythrocytes.

L. Heerup: 3.6 mill., perfectly normal.

A. Nyfeldt: The cases remind of that of a man treated with sanocrysin, with exfoliative dermatitis attended by leukocytosis, 40—50 per cent of not quite mature eosinophil cells, the sternal punctate disclosing eosinophilic bone-marrow. Does not think that there is a question of real leukemia but merely of a leukemic blood picture.

J. Engelbreth-Holm likewise doubts leukemia, since that diagnosis must be made on organ changes. Opines that the cells correspond to Winkel Smith's eosinophil cells in experimental leukemia.

L. Heerup: Some of the reported cases are obvious cases of myeloid leukemia; thinks, however, that the changes occur in cases of long standing, and that tissue eosinophilia is found, too.

H. Gormsen: In transitory lung infiltrates are found many leukocytes but few eosinophil cells.

(From the Radium Dispensary in Copenhagen).

Fridtjof Bang: *Cancerous changes of a slow course and epithelial hyperplasia in the portio vaginalis of women, and similar changes produced experimentally in guinea-pigs.*

Any question within the pathology of cancer may be discussed under the assumption of the notion: cancer cell, since the course and character of a cancer depend upon properties in the cancerous cell and its environments. The author reports a couple of cases of cancer in the portio vaginalis, where changes which must be termed superficial cancer had persisted for more than two years before the appearance of manifest cancer. The changes in the portio were characterised by dedifferentiation of the epithelium with abnormal nuclei, sometimes reminding of Bowen's disease, and with ingrowth

into gland tubes and connective tissue. In a third case, the epithelium was likewise dedifferentiated, whereas the abnormalities of the nuclei were less pronounced. This case remained stationary.

By overdosage with folliculin and inoculation of infectious substance into the vagina of guinea-pigs the author succeeded in producing, in the cervical canal, metaplasia of the columnar epithelium with ingrowth into the orifices of the gland tubes, corresponding to the changes of similar aspect which are often met with in women in case of simple erosion.

Discussion:

P. Freudenthal opines that, in case of distinct ingrowth with atypical epithelium formation and sporadic atypical growth, the histologist must regard it as cancer and leave it to the clinician to decide whether rational treatment is required. If there is a suggestion of precancerous changes, the clinician will not venture to assume the responsibility for it but will send the patient to cancer treatment.

J. Engelbreth-Holm: The matter should not be made more difficult than it is beforehand. There is no question of ingrowth but of metaplasia. There is a distinct difference between preparations from human beings and from guinea-pigs. Some authors think that there is a healing tendency.

F. Bang: The matter must be discussed with the clinicians.

Grethe Hartmann & V. Friedenreich: *Contribution to the discussion on the presence of antigen and the corresponding antibody within the same organism.*

An antigen closely related to the human A-antigen, is generally found in cattle, in the organs and particularly in the glands and the corresponding secretions of the digestive system, though very differently developed in strength. The concentration would seem to rest on a genetical basis and to show some similarity to the $A_1-A_2-A_3-A_4$ blood group system in man.

At the same time it is observed that a good many cows exhibit, in their sera, an antibody which is not distinguishable from human iso-anti-A. Thus it would seem natural to compare the strength of this antibody to the concentration of A-antigen. Such a comparison was carried out by V. Friedenreich and G. Hartmann independently of each other. In both series of observations saliva from the cows was used as the source of the A-antigen. The observations showed that the average concentration of antibody within a larger group of cows is small when the average antigen concentration is high, and inversely.

Now, it is a question of the highest interest whether the two substances, the antigen and the antibody from the same organism

react or do not react with each other. An attempt was made at elucidating this question by a test carried out on anti-A and saliva A-antigen from 76 cows. It turned out that in a good many cases the A-antigen reacted just as strongly with anti-A from the animal itself as with a human iso-anti-A. In certain cases a weaker reaction was established but the reaction never failed altogether. On the whole a fairly good agreement was found as to the affinity of the antigen to the two different kinds of sera.

An explanation of the fact that an antigen and the corresponding antibody can exist together within the same organism may thus be given. While in man the A-antigen is found throughout the cells, i. e. both in the membranes and in the plasma and, besides, in the blood corpuscles, the antigen in cattle would seem to be present only in the plasma of certain glandular cells. This observation presumably explains why, in the case of cattle, the A-antigen can exist together with anti-A, while, in the case of man, this co-existence is precluded. For in cattle the two highmolecular substances, viz. the antigen and antibody, may be assumed to be separated by cell membranes while in man they would be in direct contact with each other.

The slight interdependence between the concentration of antigen and antibody within the same animal may be explained by the fact that antigens in small amounts are continuously brought out into the circulation of the blood through the normal destruction of cells.

Phenomena of a similar character, and explainable in the same way, have previously been observed in connection with immune antibodies. Here attention may particularly be drawn to some observations by Metelnikoff (1910). They dealt with the presence of antibodies produced by immunisation with sperm from the animal (guinea-pig) itself. Other cases, such as the presence of S. S. S. and specific antibodies in serum or urine from the same individual may presumably find their explanation in the law of mass action.

Discussion:

J. Bing draws attention to the disproportion between antigen in saliva and blood of animals possibly being due to somewhat different saliva concentration in the several animals. Suggests determination of the content of dry matter.

G. Hartmann has observed ten animals for 10 days before they got anything to eat, and has found very small variations.

G. Tornowski: *Typing of strain No. 8 of the Park-Williams bacillus. Will be published in extenso in Acta path. et microbiologica scand.*

No discussion.

Gunnar Teilum: *Crebrale und viscerale Xanthomatose mit Diabetes insipidus.*

Es wird ein sezierter Fall von Cholesteringranulomatose (Xanthomatose) bei einem 42-jährigen Manne mitgeteilt. Das Leiden hat im 35. Lebensjahre ohne vorherige Krankheit mit den Initialsymptomen: Diabetes insipidus, Aufhören des Geschlechtstriebes und später periodischen diffusen Kopfschmerzen begonnen. Im Kindesalter bedeutendes Kopftrauma (Pferdehufschlag). Unter den übrigen Symptomen sind bemerkenswert: Schwindelgefühl, ab und zu Diplopie, Somnolenz, und psychische sowie physische Reduktion mit Kräfteschwund ohne elektive Parese. Bei der Sektion ausgebreitete xanthomatöse Veränderungen in den Lungen, den Pleurae, im retroperitonealen Fettgewebe, in der Adventitia der basalen Gehirnarterien und darüber hinaus zahlreiche bis 4 mm grosse, ocker- bis schwefelgelbe, xanthomatöse, in den Hemisphären ziemlich gleichmässig verteilte Herde der weissen Substanz des Cerebrum und Cerebellum. Den Herden entsprechend ausgesprochene Demyelinisation und in der Umgebung Gliavermehrung. Im Hypothalamus ausser zahlreichen kleineren perivaskulären Infiltraten ein dichtes Netzwerk von Gliafasern, während in der Hypophyse keine abnormen Befunde erhoben wurden.

Unter den wenigen früher mitgeteilten Fällen von cerebraler Xanthomatose bei der *Schüller-Christian'schen* Krankheit (*Davison, Heine, Chiari*) zeigt nur der von *Chiari* berichtete Fall so ausgesprochene Gehirnveränderungen.

Im Anschluss an die Gehirnxanthomatose werden die Lipoidgranulomatosen im allgemeinen, besonders in bezug auf Morphologie und Pathogenese, sowie Abweichungen von anderen Xanthomatosenformen besprochen. Fälle wie der mitgeteilte werden meistens diagnostische Schwierigkeiten bereiten; in dieser Verbindung ist zu betonen, dass das Vorhandensein der Symptome: Diabetes insipidus und (besonders einseitig beginnender) Exophthalmus, bei unklaren Krankheitsbildern den Gedanken an ein xanthomathöses Leiden vom *Schüller-Christian-Typus* nahelegen müsste.

(Die Arbeit wird in Beiträge z. pathol. Anat. veröffentlicht).

Keine Diskussion.

ABSTRACTS — ANALYSES — REFERATE.

Eisen bei Mutter und Kind von *H. Albers*. 348 Seiten, 53 Bilder.
Preis: geheftet RM. 18,75, geb. 20,25 RM. Verlag: Georg Thieme,
Leipzig. (Dritter Band der Serie »Zwanglose Abhandlungen auf
dem Gebiete der Frauenheilkunde« — herausgegeben von Prof.
R. Schröder).

Das Eisen wird nach Warburg's und anderen Untersuchungen als ein sehr wichtiger Faktor besonders bei Oxydationsprozessen im zellulären Stoffwechsel angesehen. Verfasser legt in vorliegender Arbeit umfassende Untersuchungen über Serumeisenbestimmungen vor, die nach der von Heilmeyer und Plötner angegebenen Methode ausgeführt sind, die sich mit einer unbedeutenden Veränderung auch zur Bestimmung des Eisengehaltes in der Milch anwenden lässt.

Der erste (klinisch-experimentelle) Teil der Abhandlung beginnt mit einem Durchgang der Serumeisenuntersuchungen bei gesunden und kranken nicht graviden Frauen; in diesem Abschnitt wird nachgewiesen, dass ein bedeutender Geschlechtsunterschied zwischen Serumeisenwerten bei Männern und Frauen besteht — ein Unterschied, der nicht durch Menstruationsblutungen bedingt ist, der aber nach dem Klimakterium zunimmt und wahrscheinlich spezifisch hormonal bestimmt ist. Normale Serumeisenwerte für gesunde Frauen in geschlechtsreifem Alter werden bis zu ca. 90 γ % gefunden.

Danach folgt eine Beschreibung über das Verhalten des Serumeisens bei einer Reihe von gynäkologischen Erkrankungen: Blutungen, Myome, Carcinome, rezidivierende Carcinome, Radium- und Coutardbehandelte Carcinome und verschiedene genitale Entzündungszustände.

Die Krankengeschichten sind in Schemen angeführt, die eine gute Übersicht über alles von Interesse geben, besonders auch über die gleichzeitig mit den Serumeisenbestimmungen ausgeführten Bestimmungen des Hämoglobin, Zählung der roten Blutkörperchen, Farbindex u. s. w.

Die Beschreibung des Serumeisens unter der Schwangerschaft und während der Geburt enthält viele interessante Einzelheiten und wird mit einer Reihenuntersuchung über die Regulation ergänzt, die nach der Geburt einsetzt.

Ferner wird auf die Bedeutung von grossen Blutverlusten während und nach der Geburt eingegangen, sowie auf die Bedeutung der genuinen und infektiös bedingten Schwangerschaftsanämien und auf das Verhalten des Serumeisens bei Schwangerschaftstoxikosen und Abort.

Den Abschluss des klinisch-experimentellen Teils bilden Untersuchungen über die intrauterine und postnatale Versorgung des Kindes mit Eisen. Es wird gezeigt, dass eine Reihe von Umständen Bedeutung für den Eisengehalt der Muttermilch hat.

Es wird eine Schätzung von dem Eisenbedarf des Säuglings vorgenommen und nachgewiesen, dass dieser Bedarf mit der gewöhnlich angewandten künstlichen Ernährung nicht gedeckt werden kann, ebenso wird nachgewiesen, dass die Milch, die eine ammende kranke Mutter ihrem Kind gibt, sehr oft einen herabgesetzten Eisengehalt zeigt.

In einem besonderen Abschnitt wird des Verhalten des Eisens bei Frühgeburten beschrieben.

Der zweite Teil dieser Arbeit enthält eine ausserordentlich gründliche Besprechung der therapeutischen Möglichkeiten, um die Serum-eisenwerte bei den Zustände zu erhöhen, bei denen man durch die experimentellen Untersuchungen im ersten Teil des Buches Eisenmangel nachgewiesen hat.

Die vorliegende Arbeit ist ein Führer durch die Physiologie und Pathologie des Eisenstoffwechsels, sie enthält eine Menge wertvoller und zum Teil ganz neuer Aufschlüsse besonders über den Eisenstoffwechsel bei Mutter und Kind.

Das Gebiet ist wohl zu speziell und die Behandlung zu breit, als dass das Buch in grösserem Ausmass von praktischen Ärzten gelesen wird, aber für den Gynäkologen, den Pädiater und den Internisten wird es von Interesse sein. Die grafischen Darstellungen sind ausgezeichnet und das Buch ist leicht zu lesen; ausgedehnter Gebrauch von Spatierung erleichtert die Orientierung beim Aufschlagen.

C. J. M.

EINIGE FORMELN DER MITTLEREN FEHLER DER AUS DEN BLUTGRUPPENFREQUENZEN HERGELEITETEN FUNKTIONEN.

Von *Bengt Jonsson*.

(Eingegangen bei der Redaktion am 25. April 1939).

Wertvolle Formeln der mittleren Fehler, der aus den Blutgruppenfrequenzen hergeleiteten Funktionen liegen in der Literatur besonders in den Publikationen Bernsteins (u. a.)¹⁾ vor.

Diese Angaben beziehen sich jedoch in der Hauptsache auf die Verhältnisse nach der s. g. Dreigentheorie, während dagegen die Verhältnisse innerhalb des MN-Systems nicht so viel Beachtung gefunden haben und vor allem die Fragen, welche durch die Viergentheorie hervorgerufen werden, nur einer sehr stiefmütterlichen Behandlung unterzogen worden sind (vgl. u. a. Wellisch).²⁾

Um die genaue Analyse des Blutgruppenmaterials, die wir in unserem Laboratorium als notwendig betrachten, durchführen zu können, habe ich mich darum genötigt gesehen mehrere Formeln der mittleren Fehler vor allem innerhalb des Viergensystems auszuarbeiten. Diese Formeln hervorzuheben finde ich, da speziell mathematisch-statistisch Sachverständige sich für die hierher gehörenden Probleme nicht hinreichend interessiert haben, angebracht.

Bei der Ausarbeitung der Formeln habe ich die Funktionen in Serie entwickelt, wobei es sich zeigte, dass man eine

Formel des mittleren Fehlers $\mu f(a) = \frac{df(x)}{dx} \mu a$ für $x=a$ in grossem Umfang verwenden kann. Hierbei muss jedoch selbstverständlich Rücksicht auf die bisweilen ziemlich verwickelten Korrelationsverhältnisse genommen werden.

In den nachstehenden Formeln werden die Blutgruppen- bzw. die Genfrequenzen als Dezimalbrücke angegeben. Die Blutgruppen- bzw. Gensumme ist folglich immer gleich 1. S gibt die Zahl der untersuchten Individuen an.

Bezüglich der Bedingungen, welche man, damit ein Blutgruppenmaterial sich überhaupt für statistische Bearbeitung eignen soll, aufstellen muss, verweise ich auf frühere Veröffentlichungen (Wolff und Jonsson).^{3, 4)}

Für die relativ einfachen wichtigsten Funktionen innerhalb des MN-Systems gab ich in einer früheren Arbeit (Wolff und Jonsson)⁴⁾ die folgenden Formeln der mittleren Fehler an.

$$1) \quad m = \sqrt{M} \quad \mu_m^2 = \frac{1-M}{4S}$$

$$2) \quad n = \sqrt{N} \quad \mu_n^2 = \frac{1-N}{4S}$$

$$3) \quad D = 1 - (m + n) \quad \mu_D^2 = \frac{1}{4S}$$

$$4) \quad mn = \sqrt{M} \cdot \sqrt{N} \quad \mu_{mn}^2 = \frac{1-MN-(MN)^2}{4S}$$

Die Formeln 1), 2) und 3) habe ich später, und zwar mit ganz anderer Herleitung in früheren Arbeiten von Wiener^{5, 6)} wiedergefunden und sie dürften folglich als sichergestellt gelten können.

Bernstein¹⁾ gibt für die Genfrequenzen nach der Dreigen- theorie und ihre mittleren Fehler (nach der Berichtigung einer offenbaren Vertauschung der μ_p - und μ_q -Werte in der zitierten Abhandlung, vgl. Wolff und Jonsson⁴⁾ die folgenden Formeln an.

$$\begin{aligned}
5) \quad r &= \sqrt{O} & \mu^2_r &= \frac{1-0}{4S} \\
6) \quad p &= 1 - \sqrt{O+B} & \mu^2_p &= \frac{A+AB}{4S} \\
7) \quad q &= 1 - \sqrt{O+A} & \mu^2_q &= \frac{B+AB}{4S} \\
8) \quad D &= 1 - (r+p+q) & \mu^2_D &= \frac{pq}{2S(1-p)(1-q)}
\end{aligned}$$

Für die Berechnung der mittleren Fehler der nach der Berechnungsweise des Laboratoriums angegebenen Genfrequenzen in dem Viergensystem (Wolff und Jonsson)³⁾ können von diesen Formeln nach Bernstein nur die Formeln 5) und 7) direkt gebraucht werden.

Die von uns angewandte Formeln für p , p_1 und p_2 sind alle von dem Typus $\sqrt{a} - \sqrt{b}$.

Für diesen Ausdruck habe ich die folgende Formel entwickelt

$$\begin{aligned}
9) \quad \mu^2 (\sqrt{a} - \sqrt{b}) &= \frac{1}{4ab} \cdot \\
&\left[b \cdot \mu^2_a + a \cdot \mu^2_b + \sqrt{ab} \cdot \left(\mu^2_{a-b} - \mu^2_a - \mu^2_b \right) \right]
\end{aligned}$$

mit für

$$9 \text{ a) } p = \sqrt{O + A_1 + A_2} - \sqrt{O} \quad \left\{ \begin{array}{l} a = O + A_1 + A_2 \\ b = O \\ a-b = A_1 + A_2 \end{array} \right.$$

für

$$9 \text{ b) } p_1 = \sqrt{O + A_1 + A_2} - \sqrt{O + A_2} \quad \left\{ \begin{array}{l} a = O + A_1 + A_2 \\ b = O + A_2 \\ a-b = A_1 \end{array} \right.$$

und für

$$9 \text{ c) } p_2 = \sqrt{O + A_2} - \sqrt{O} \quad \left\{ \begin{array}{l} a = O + A_2 \\ b = O \\ a-b = A_2 \end{array} \right.$$

Der mittlere Fehler des nach Bernsteins Berechnungsweise erhaltenen p -Wertes (Formel 6) und der mittlere Fehler nach

der von mir angegebenen Formel 9 zeigen bei der Bearbeitung von mehreren Materialien eine gute Übereinstimmung, was mir gewissermassen als eine Stütze für die Verwendbarkeit der Formel 9 zu dienen scheint.

Bei einer Bearbeitung eines Blutgruppematerials von dem Gesichtspunkte der Viergentheorie aus spielt die Quote p_1/p_2 eine ganz besonders bedeutungsvolle Rolle.

Diese Quote soll nämlich nach der Theorie gleich dem Verhältnis zwischen der A_1B -Frequenz und der A_2B -Frequenz und gleich dem Verhältnis zwischen der Frequenz von A_1 -Kindern und der Frequenz von A_2 -Kindern bei den O-Müttern sein. Für die Nachprüfung der Technik spielt auch eine gute Übereinstimmung der p_1/p_2 -Quote und der A_1B/A_2B -Quote bei Erwachsenen und Kindern eine entscheidende Rolle.

Für die Berechnung des mittleren Fehlers der wichtigen Quote p_1/p_2 habe ich die folgende Formel aufgestellt

$$10) \mu \frac{p_1}{p_2} = \frac{p_1^2}{p_2^2} \cdot \left[\frac{1}{p_1^2} \cdot \mu^2 + \frac{1}{p_2^2} \cdot \mu^2 + \frac{1}{p_1 p_2} \left(\mu^2 - \mu^2 - \mu^2 \right) \right]$$

Als ein Beispiel wird der unten folgende Auszug eines Materiales von 6.000 Personen (2.000 Müttern, 2.000 Kindern und 2.000 angeblichen Vätern) nach der gewöhnlichen Methode des Laboratoriums zusammengestellt (vgl. Wolff und Jons-son)^{3,4)} hervorgelegt. Dieses Material wird binnen kurzem von uns ausführlich publiziert.

Tab. 1.

Erwachsene $p_1/p_2 = 2,824 \pm 0,138$	Kinder $p_1/p_2 = 2,43$
Erwachsene $A_1B/A_2B = 2,42$	Kinder $A_1B/A_2B = 2,65$
A ₁ -Kinder/A ₂ -Kinder der O-Mütter = 2,73.	

Wie ersichtlich liegt eine sehr schöne Übereinstimmung zwischen den gefundenen Werten und den Forderungen der Theorie vor.

Einige andere statistische Werte aus demselben Materiale

werden unten hervorgelegt. r_a , p_a und q_a geben die Genfrequenzen nach Bernstein und r , p_1 , p_2 und q die Genfrequenzen nach unserer Berechnungsweise an. Die Zahlen gelten für die 4.000 Erwachsenen des Materiales.

Tab. 2.

O	37,725 % $\pm \sqrt{0,5873}$ %
A ₁	36,800 % $\pm \sqrt{0,5814}$ %
A ₂	10,550 % $\pm \sqrt{0,2359}$ %
B	10,050 % $\pm \sqrt{0,2260}$ %
A ₁ B	3,450 % $\pm \sqrt{0,0833}$ %
A ₂ B	1,425 % $\pm \sqrt{0,0351}$ %

Tab. 3.

r_a	$= 0,61421 \pm 0,00624$
p_a	$= 0,30880 \pm 0,00571$
q_a	$= 0,07764 \pm 0,00305$
$r_a + p_a + q_a$	$= 1,00065 \pm 0,00216$

Tab. 4.

r	$= 0,61421 \pm 0,00624$
p_1	$= 0,22756 \pm 0,00526$
p_2	$= 0,08059 \pm 0,00375$
q	$= 0,07764 \pm 0,00305$
$\left. \begin{array}{l} p_1 \\ p_2 \end{array} \right\} 0,30815 \pm 0,00599$	

Tab. 5.

M	$= 33,975 \% \pm \sqrt{0,5608}$
MN	$= 48,125 \% \pm \sqrt{0,6241}$
N	$= 17,900 \% \pm \sqrt{0,3674}$

Tab. 6.

m	$= 0,58289 \pm 0,00642$
n	$= 0,42308 \pm 0,00716$
m + n	$= 1,00597 \pm 0,00791$
2 mn	$= 0,49322 \pm 0,00847$

Zuletzt will ich als besonders wünschenswert hervorheben, dass ein speziell statistisch ausgebildeter Forscher die Viergentheorie zur wirklich durchgreifenden mathematischen Behandlung in einer auch für die grosse Mehrzahl von uns mehr biologisch orientierten Arbeitern des Gebietes verständlichen und verwendbaren Weise aufnähme.

Bei dieser Bearbeitung sollte auch Rücksicht auf die Möglichkeit einer weiteren Multiplizität der Allelie innerhalb des ABO-Systems, welche aus den Untersuchungen über die sogenannten B_2 - und A_3 -Rezeptoren hervorzugehen scheint, genommen werden. Auch sollte man die spezielle Form von multipler Allelie, welche durch die Entdeckung des sogenannten N_2 -Rezeptors innerhalb des MN-Systems als festgestellt scheint, berücksichtigen.

LITERATURVERZEICHNIS.

1. *Bernstein, F.*: Z. indukt. Abstammungslehre Bd. 54 (1930) S. 400
 2. *Wellish, S.*: Handbuch der Blutgruppenkunde (1932).
 3. *Wolff, Erik u. Jonsson, Bengt*: Dtsch. Z. gerichtl. Med. Bd. 22 (1933) S. 65.
 4. — *Acta path. et microbiol. Scand.* Vol. XII. Fasc. 1—2 (1935) S. 131.
 5. *Wiener, A.*: J. of Immunology Vol. XXI, No. 2 (1931) S. 157.
 6. — *Human Biology*, Vol. 7, No. 2 (1935) S. 222.
-

UNTERSUCHUNGEN ÜBER CHRONISCHE LYMPHADENOSE BEI DÄNISCHEN RINDERN.

(Ausgeführt mit Unterstützung des *Anders Hasselbalch* Fond
zur Bekämpfung der Leukämie).

Von Obertierarzt *J. Egehoj*, Skelskor, Dänemark.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. Nov. 1911).

Morphologische Leukozytenuntersuchungen bei leukotischen Rindern sind nur relativ selten vorgenommen worden. Die einzelnen Untersucher geben verschiedene Werte für die Zahl der Erythrozyten und Leukozyten sowie für die Hämoglobinmenge im gesunden Rinderblut an.

Die Angaben für die Erythrozytenzahl variieren von 6 bis 7 Millionen, die Leukozytenzahl beträgt ca. 8000 pr. cmm Blut, die Hämoglobinmenge beläuft sich auf etwa 70 % (*Storch, Reyfik-Bey, Schultz, Dimmock & Thomsen, Goodall, du Toit, C. Picning*). Bei leukotischen Rindern hat man von 3620 bis zu 159.360 Leukozyten in 1 cmm Blut gefunden (*Knuth & Volkmann, du Toit, Reisinger, Udall & Olafson, C. Picning, J. Egehoj*). Die relativen Leukozytenwerte betragen im gesunden Rinderblut: Lymphozyten 49–61 %, neutrophile Granulozyten 20–43 %, eosinophile Granulozyten 7–13,5 %, basophile Granulozyten ca. 0,5 %, Monozyten ca. 7,5 % (*Reyfik-Bey, Dimmock & Thomsen, Lejeune, du Toit, C. Picning*). Bei leukotischen Rindern findet man folgende Angaben über den relativen Anteil der Leukozyten im Blutbilde: Lymphozyten 14,5–98,2 %, neutrophile Granulozyten 4–57,5 %, eosinophile Granulozyten 0,5–10,5 %, Monozyten 4–17 %, Bluthistiozyten 11,25–12,75 % (*Knuth & Volkmann, du Toit, Reisinger, Udall & Olafson, J. Egehoj*).

Beim Rinde sind beschrieben worden Fälle von lymphatischer und myeloischer Leukose (*L. Lund, J. Howard Jones, J. Egehoj*), von Retikulo-Endotheliose (*Lübke*), von reaktiver Retikulo-Endotheliose (*J. Egehoj*) sowie eine eigenartige Rinderkrankheit, die von *Knuth & Volkmann, du Toit* u. a. als Lymphozytomatose bezeichnet wird. Dieselbe wird hämatologisch hauptsächlich durch das Vorkommen grosser mononukleärer Zellen im peripheren Blut gekennzeichnet. *Knuth & Volkmann* sehen die grossen mononukleären Blutzellen bei der Lymphozytomatose für Lymphozyten an. Doch haben sie auf die grosse Ähnlichkeit zwischen den pathologischen Blutzellen der Lymphozytomatose und denen bei der Leukosarkomatose (*Sternberg*) aufmerksam gemacht. *Knuth* hat ausserdem die Ansicht geäussert, dass das Blutbild der Lymphozytomatose nicht dem Blutbild bei der lymphatischen Leukämie des Menschen analog ist. Die mononukleären Blutzellen der Lymphozytomatose werden von *Knuth & Volkmann* in kleine, mittelgrosse und grosse Zellen eingeteilt. *Du Toit* behauptet, dass die pathologischen Blutzellen der Lymphozytomatose grosse Ähnlichkeit mit den pathologischen Blutzellenformen einiger menschlicher Leukämien haben. Er bezeichnet die pathologischen Blutzellen der Lymphozytomatose als Lymphoidozyten, um hierdurch ihre Ähnlichkeit mit *Pappenheim's* und *Ferrata's* Lymphoidozyten zu unterstreichen. Er nimmt übrigens an, dass es zwei verschiedene Lymphozytomatoseformen gibt, eine weniger bösartige, bei der das Blutbild von kleinen Lymphozyten beherrscht wird, und eine mehr bösartige, die er lymphatische Lymphoidozytenleukämie nennt und bei der im Blutbild die sog. Lymphoidozyten vorherrschen. Seiner Ansicht nach ist die letztgenannte Form identisch mit der lymphatischen Leukämie des Menschen und die erstgenannte mit der myeloischen Leukämie des Menschen.

Eigene hämatologische Untersuchungen.

Die untersuchten Tiere waren monatelang krank gewesen. Die Erkrankung hatte einen ausgeprägt chronischen, schleichenden Verlauf und zeigte als Charakteristikum eine Vergrösserung der meisten oder aller Lymphknoten. Mit einer einzigen Ausnahme waren die untersuchten Tiere von 6 bis 9 Jahre alt. Die Blutuntersuchungen wurden an Ohrvenenblut vorgenommen. Die Erythrozyten- und Leukozytenzahl wurde durch Untersuchung in der *Thoma's* Zählkammer festgestellt, die Hämoglobinmenge nach *Sahli*. Die Oxydaseprobe wurde nach *Schultz-Winkler* ausgeführt, die Supravitalfär-

bung mit Neutralrot-Janusgrün nach *Nyfeldt*. Die morphologischen Untersuchungen der Leukozyten wurden in trockenfixierten Ausstrichpräparaten vorgenommen, welche mit *Giemsa-Romanowsky*' Farblösung unter Anwendung von *Nyfeldt's* Pufferlösung gefärbt waren.

Ergebnisse der Untersuchungen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind summarisch in Tabelle 1 wiedergegeben. Zellen, die in morphologischer Beziehung von normalen Zelltypen abweichen, sind unter der Bezeichnung pathologische Zellen angeführt. In Übereinstimmung mit *W. Ehrlich* ist die Bezeichnung Hämoytoblast für die Zellen vorbehalten, welche morphologisch dem sog. Zelltyp des neounitarischen Triebismus entsprechen, d. h. der Stammzelle für die irreversibel differenzierten Myeloblasten, Lymphoblasten und Monoblasten als Mutterzellen für Granulozyten, bzw. Lymphozyten und Monozyten.

Die Tabelle zeigt, dass alle untersuchten Tiere, mit Ausnahme von R 3 und R 4, anämisch waren. Die Oligozythämie war so kräftig, dass die Erythrozytenzahl der angegriffenen Tiere unter der Hälfte der Erythrozytenzahl gesunder Tiere lag. Gleichzeitig wurde eine Verminderung der Hämoglobinemenge nachgewiesen. Ausserdem wurde bei den angegriffenen Tieren eine ausgesprochene Anisozytose gefunden, während gleichzeitig Normoblasten in den untersuchten Präparaten allgemein vorkamen. Die Leukozytenzahl variierte bei den untersuchten Tieren sehr stark. Bei E 1 war sie leukopenisch, bei L 1 subleukämisch. Anscheinend am höchsten war die Leukozytenzahl in den letzten Tagen der Erkrankung. Die Untersuchungen zeigen, dass die bei den Tieren auftretende Lymphadenose in den meisten Fällen mit einer leichten Leukozytose und einer kräftigen Anämie verbunden ist.

Das relative Blutbild weist jedoch die interessantesten Veränderungen auf. Die Anzahl der Monozyten und Granulozyten war nahezu normal. Bei der Hälfte der Tiere (E 1, R 1, O 1, O 2) wurde relative und absolute Lymphopenie, bei den übrigen eine leichte relative und absolute Lympho-

Tabelle 1.

Lauf-Nr.	Datum, Jahr	Erythrozyten Millionen	Hämoglobin %	Leukozyten	N. Myelozyten	N. Stabkernige	N. Segment- kernige	Lymphozyten	Hämozyto- blasten	Monozyten	Pathologische mononukleäre	Eosinophile	Nicht diagnostiziert
E 1	30/4.40	5,46	51	3840	—	13	28,75	31,75	—	4	8,75	10,75	2
	2/5.40	4,22	52	7600	—	10,75	44,0	22,5	1,5	6,0	11,0	4,25	
	4/5.40	4,4	48	18200	—	6,75	42,75	13,75	2,75	3,75	23,5	5,75	1
R 1	11/1.41	3,1	42	17400	—	10,5	42,5	18	—	1	28	—	—
O 1	23/7.40	4,0	52	15800	—	6,5	14	44,5	—	3	28,5	3,5	—
	30/7.40	3,82	48	16400	—	8,5	14,5	41,5	0,5	5	24,5	5,5	0,5
	7/8.40	3,6	42	22800	—	15	42,5	26	1,5	1,5	12	1,5	—
O 2	25/8.40	4,1	57	12750	—	8,5	35	29	—	4,5	21,5	1,5	—
R 2	12/10.40	4,48	54	8000	—	1,5	24,5	46,5	1	2,5	21,5	2,5	—
	15/11.40	4,40	52	6000	—	1	17	62	—	1	17	1	1
R 3	12/10.40	6,4	70	10600	—	2,5	23,5	45	—	4,5	20,5	4	—
	15/11.40	6,2	64	10800	—	4	21,5	50,5	—	3,0	18,5	2,5	—
R 4	12/10.40	5,83	55	14000	—	2	14,5	48	—	2	29,5	4	—
	15/11.40	5,2	53	12800	—	3,5	16	43	—	2	32	3,5	—
L 1	4/12.40	3,86	56	24600	—	7	41,5	24	—	3,5	20	4	—
L 2	7/7.41	3,94	51	26800	—	—	8,5	55,5	1	2,5	31,5	1	—

zytose nachgewiesen. Relative Neutrophilie, aber absolute Neutropenie fand sich bei E 1, R 1 und O 2, bei den übrigen sowohl relative als auch absolute Neutropenie. Eine ausgesprochene Linksverschiebung des neutrophilen Kernbildes gab es bei E 1, R 1, O 1 und O 2, bei den übrigen war das neutrophile Kernbild unverändert. Hämozytoblasten kamen nur ausnahmsweise und stets in spärlicher Anzahl vor. Die relativen Werte der pathologischen Zellen schwankten zwischen 8,75 und 31,5 %, ihre niedrigste absolute Anzahl war 259, ihre höchste 8452.

Die meisten pathologischen Zellen waren von 15 bis 25 My gross, die grössten massen bis zu 30, die kleinsten 10 My. Die meisten pathologischen Zellen waren rund. Das Protoplasma war relativ breit. Der exzentrisch gelegene Kern füllte in der Regel nur ca. die Hälfte des Zellkörpers. Die relativ grössten Kerne gab es in den kleinsten Zellen. Viele Kerne waren rund, eine Anzahl waren oval; dagegen kamen keine segmentierten Kerne bei den pathologischen Zellen vor. Die Kernmembran der pathologischen Zellen war dünn, glatt und scharf. Das Chromatin bildete ein zartes, weitmaschiges Netz, in dem Chromatinmassen von verschiedener Form und Grösse eingelagert waren. Die Chromatinmassen zeigten keine Neigung, sich längs der Kernmembran zu lagern. Sie waren untereinander und mit der Kernmembran durch das zarte Chromatinnetz verbunden. Die Kernstruktur war im übrigen durch eine scharfe Trennung zwischen Basis- und Oxychromatin gekennzeichnet. Die Kerne der jugendlichsten Zellen enthielten Nukleoli (1 bis 6 oder 8). Die Nukleoluswand war undeutlich, es gab niemals Anhäufung grösserer Chromatinmassen längs derselben. Das Protoplasma färbte sich schwach basisch oder blieb ungefärbt. Es war oft vakuolisiert, und es fehlte ihm jede Form von Granulation. Die pathologischen Zellen zeigten keine Oxydasereaktion und reagierten verschiedenen gegenüber Supravitalfärbung mit Neutralrot-Janusgrün. In einigen der Zellen gab es nur einzelne janusgrün gefärbte Mitochondrien; andere reagierten bei der Supravitalfärbung wie Lymphozyten, andere wieder wie Monozyten und der Rest schliesslich reagierte wie sog. Bluthistiozyten. Die verschiedenen extremen Reaktionsformen waren durch gleichmässige Übergänge verbunden.

Die bei deutschen Rindern verbreitete sogenannte Lymphozytomatose wurde von *Knuth & Volkmann* ursprünglich für eine besondere Leukoseform beim Rinde angesehen, die mit der Leukosarkomatose des Menschen gleichzustellen war. Diese Auffassung wurde später wieder verlassen, und zwar erst zugunsten der Auffassung, dass die Lymphozytomatose eine lymphatische Leukose sei, später aber zugunsten einer

vom Trialismus beeinflussten Auffassung der Erkrankung als einer Retikulo-Endotheliose (*Dobberstein, Lübke*).

Die Morphologie der pathologischen Blutzellen, ihre Reaktion bei der Supravitalfärbung und ihre Oxydasereaktion beweisen, dass sie keine Myeloblasten oder Promyelozyten sein können. Der Mangel des Blutbildes an Hiatus leucaemicus (*Naegeli*) zeigt, dass die Krankheit keine myeloische Leukose sein kann, weil die Hauptsymptome derselben fehlen.

Aus der Morphologie der pathologischen Blutzellen ergibt sich, dass sie keine Lymphozyten oder Lymphoblasten sind. Es lässt sich nicht leugnen, dass es eine gewisse Ähnlichkeit zwischen den pathologischen Blutzellen und Lymphozyten gibt. Doch ist die Ähnlichkeit nur oberflächlich; denn die feinere Kernstruktur der pathologischen Blutzellen weicht gänzlich von der der Lymphozyten ab. Wenn die Zellmorphologie der Zelldiagnostik zugrunde gelegt wird, müssen die pathologischen Blutzellen unter Hinweis auf *Lenaz'* Anschauungen als Zellen aufgefasst werden, die anderer Art als die Lymphozyten sind. Dazu kommt, dass die pathologischen Blutzellen mit ihren chromatinreicheren, keine Kernkörperchen enthaltenden Kernen augenscheinlich reife Zellstadien der jugendlichen pathologischen Blutzellen mit chromatinarmen, Kernkörperchen enthaltenden Kernen darstellen. Da aber die letzteren, wie sich aus ihrer Morphologie ergibt, sich nicht mit Lymphoblasten identifizieren lassen, können auch ihre reifen Formen nicht mit Lymphozyten identifiziert werden, wenn man die übliche Auffassung von der Hämozytogenese der Bestimmung der Zellen zugrunde legt. Es geht hieraus hervor, dass die Morphologie der pathologischen Blutzellen in Verbindung mit der festgestellten, absoluten und relativen Lymphopenie beweist, dass die genannte Rinderkrankheit hämatologisch gesehen nicht mit der lymphatischen Leukose des Menschen identifiziert werden kann.

Die pathologischen Blutzellen können dann, den Verhältnissen bei sog. Retikulo-Endotheliosen und *Sternberg's* Leukosarkomatose des Menschen entsprechend, entweder Bluthistiozyten oder ins Blut ausgeschwemmte Blastomzellen sein.

Die Morphologie der pathologischen Blutzellen und ihre Reaktion bei der Supravitalfärbung deuten an, dass sie ins Blut ausgeschwemmte, retikulo-endotheliale Zellen sind. Es darf jedoch nicht übersehen werden, dass die Reaktion bei der Supravitalfärbung in der gleichen Weise verläuft wie bei pathologischen Lymphozyten und wie bei Lymphozyten in Gewebskultur (*Maximow, Bloom, Nyfeldt*). Die Reaktion bei Supravitalfärbung mit Neutralrot — Janusgrün gibt indessen eine ungenügende Grundlage für die Zytodiagnostik ab, da die Reaktion selbst in gesundem Blute mit gradweisen Übergängen von Lymphozyten über Monozyten zu Histiozyten verläuft (*Bloom, Hall*). Gegen den retikulo-endothelialen Ursprung der pathologischen Blutzellen spricht jedoch, falls man die trialistische Auffassung der Hämozytopoiese (*Schilling, Holler, Aschoff, Schittenhelm & Erhardt* u. a.) zu grundelegt, der morphologische Unterschied zwischen dem Monoblasten (*Schilling, Naegeli, Buerker, Schwirtschewskaja*) und den hier beschriebenen, pathologischen unreifen Blutzellen. Die Kerne der reifen pathologischen Blutzellen ähneln sehr den Monozytenkernen, wohingegen das färberische Verhalten des Protoplasmas bei diesen beiden Zelltypen verschieden ist. Die reifen pathologischen Blutzellen haben also Eigenschaften (Morphologie, Supravitalfärbung), welche andeuten können, dass sie eine andere Zellart als Monozyten darstellen. Wenn das aber der Fall ist und wenn die Morphologie der unreifen pathologischen Blutzellen ebenfalls gegen die Identität derselben mit Monoblasten spricht, muss das ein Ausdruck dafür sein, dass die unreifen pathologischen Blutzellen eine andere Zellart repräsentieren als die, die von den Trialisten (*Schilling, Franco & Ferrata, Reitano, Espacito, Alder* u. a.) für die Mutterzellen der Monozyten angesehen wird, und dann können die pathologischen Blutzellen hämatologisch gesehen mit Monozyten nicht identifiziert werden.

Die Morphologie der pathologischen Blutzellen und ihre Reaktion bei der Supravitalfärbung deuten indessen daraufhin, dass sie retikulo-endothelialen Ursprungs sind. Hiermit

soll jedoch nicht gesagt sein, dass sie deshalb mit eigentlichen Blutzellen gleichgestellt werden können. Es sei in diesem Zusammenhange daran erinnert, dass die Bluthistiozyten sich teils aus Zellen des retikulo-endothelialen Systems, teils aus Monozyten entwickeln (Aschoff & Kiyono, Maximow, Bloom, W. Ehrich, Masugi, Sabin, Doan & Cunningham u. v. a.). Die Anschauung, dass die pathologischen Blutzellen retikulo-endotheliale Deszendents sind, ist in Übereinstimmung mit der Auffassung derselben als Leukosarkomzellen; denn in den letzten Jahren ist mehrfach nachgewiesen worden, dass beim Menschen maligne Neoplasmen — sog. Retothelsarkome — von retikulo-endotheliale Ursprunge auftreten (Roulet, de Oliveira).

Die Ergebnisse

der hämatologischen Untersuchungen sind, dass die pathologischen Blutzellen bei den untersuchten dänischen Kühen grosse Ähnlichkeit mit gewissen Formen von sog. Bluthistiozyten haben. Das relative Bluthild zeigt jedoch, dass die Tiere nicht von einer besonderen Leukoseform angegriffen waren, z. B. einer sog. Retikulo-Endotheliose. Die Blutuntersuchungen ergeben, dass es sich eventuell nur um eine reaktive Retikulo-Endotheliose handeln kann, falls man hierunter eine hämatologische Reaktion versteht, die durch das Auftreten einer grösseren Anzahl retikulo-endothelialer Zellen im peripheren Blute charakterisiert ist. Die Untersuchungen bedingen als Diagnose entweder

*Retikulo-Endotheliozytomatose oder
Leukosarkomatose,*

wobei die letztere zum Ausdruck bringt, dass möglicherweise eine Ausschwemmung von Geschwulstzellen in das Blut vorliegt. Es ist nicht möglich, durch eine hämatologische Untersuchung der Diagnose näher zu kommen.

Das pathologisch-anatomische und histologische Bild der Krankheit.

Die Beschreibungen der veröffentlichten Fälle von Rinderleukose sind oft mangelhaft. Es ist daher zweifelhaft, ob alle als Rinderleukose diagnostizierten Fälle mit Recht als solche bezeichnet werden. Die Diagnose Rinderleukose umfasst vermutlich eine bunte Sammlung verschiedenartiger Krankheiten, die kaum alle mit den Menschenleukosen identisch sind, falls hierunter primäre Hämoblastosen in Orth's Auffassung verstanden werden. (Henschen, Nieberle, Dobberstein & Paarmann). Die Grenzen zwischen lymphatischer Leukose und Lymphosarkomatose sind stets fließend gewesen. Die Schwierigkeit der Abgrenzung der Krankheiten ist grösser geworden, seitdem verschiedene Forscher (Furth, Seibold & Rathbone, Potter & Richter, Engelbreth-Holm, Oberling & Guérin, Snijders u. a.) mit dem gleichen Zellstamme bei Versuchstieren sowohl leukotische als auch blastomatische Veränderungen, je nach der Applikation des Impfmateriales, haben hervorrufen können. In vielen der beschriebenen Fälle von Rinderleukose fehlen Blutuntersuchungen am lebenden Tier. Man hat diesen Fällen jegliche Bedeutung für die Entscheidung in der Frage, ob es sich um Rinderleukose handle, aberkennen wollen. Das ist jedoch wahrscheinlich fehlerhaft; denn, wenn nur die histologischen Veränderungen genau beschrieben sind, kann man sich trotz fehlender Vitaluntersuchung des Blutes eine Ansicht darüber bilden, inwieweit die Krankheit eine Leukose darstellt oder nicht (Dobberstein & Paarmann). Das Blutbild ist sicherlich ein wichtiges, aber deshalb doch nicht ein pathognostisches Symptom für die Diagnose Leukose (Sternberg).

Kühe werden anscheinens öfter von Leukose befallen als Stiere; doch ist die Krankheit auch bei Stieren nachgewiesen worden (Esser & Schütz, Zietzschmann, Volkmann, Reisinger, Harrewell). Die Erkrankung kommt in den meisten Kulturländern vor. Sie tritt besonders häufig in bestimmten Gegenden Deutschlands auf. So ist sie 10 bis 15mal so häufig bei dem Vieh in Sachsen als im übrigen Teil Deutschlands (Frey). Ursprünglich nahm man an, dass die Krankheit auf bestimmte Teile Ostpreussens beschränkt war, welche Anschauung jedoch spätere Untersuchungen widerlegt haben (Wittstock, Aronsohn, Ewers).

Knuth und Volkmann glaubten ursprünglich, dass die von ihnen untersuchte Viehkrankheit eine besondere Leukoseform des Rindes darstellte, welche in der Mitte zwischen lymphatischer Leukose und Sternberg's Leukosarkomatose stand. Knuth gab später diesen Standpunkt auf und betonte in seinen neuesten Veröffentlichungen in Übereinstimmung mit Nieberle, Wirth, Marek, Jarmai und Lund,

dass die Lymphozytomatose des Rindes mit der lymphatischen Leukose des Menschen identisch sei. *Dobberstein & Paarmann* heben die ätiologischen und histologischen Ähnlichkeiten zwischen der Lymphozytomatose des Rindes und der sog. Hühnerleukose, dem sog. Roussarkom, dem sog. Wienersarkom und der sog. perniziösen Anämie des Pferdes hervor.

Bezüglich der Häufigkeit der Rinderlymphozytomatose liegen hauptsächlich deutsche Untersuchungen vor. *Franke* fand unter 13151 Rindern Leukose bei 0,34 %. *Junack* sah Leukose bei 0,13 % aller untersuchten Tiere. Er teilt mit, dass die Erkrankung 2—3 mal so häufig vorkommt als vor 25 Jahren. *Lockau* fand unter 12582 Tieren 0,56 % und unter 11614 0,76 % von Leukose befallen. *Dobberstein & Paarmann* sahen Leukose bei 0,15 bis 0,4 % aller Schlachttiere. Die Krankheit tritt hauptsächlich bei 5 bis 10 Jahre alten Tieren auf, und sie ist am häufigsten im Sommer und den Herbstmonaten (*Lockau*). Das Leiden scheint am reichlichsten bei Rindern vertreten zu sein, die in sumpfigen und moorigen Gegenden leben (*Junack*). Unter den deutschen Rindern zeigt die Krankheit einen allmählichen Anstieg von 0,4 ‰ im Jahre 1924 bis auf 1,08 ‰ im Jahre 1934 (*Heidrich*). Obschon das Leiden bei älteren Tieren am häufigsten ist, ist es doch auch bei Tieren im Alter von 8 Tagen bis zu 12 Monaten nachgewiesen worden (*Ewers, Knoll, Eilmann, Wolff, Egehoj, Ade, Kemény, de Jong, Stern, Udall & Olafson, v. d. Slugs & Korewaar*). Die Erkrankung ist jedoch bei Jungtieren anderer Art und steht hier augenscheinlich den menschlichen Leukosen näher (*Lund*). Die Fälle bei den jungen Tieren müssen mit einem gewissen Vorbehalt betrachtet werden, da sie augenscheinlich oft infektiös bedingte Reaktionen darstellen (*Henschen, Junack*). Doch würde es nach *Dobberstein & Paarmann's* Auffassung allzu rigoristisch sein, wenn man alle Fälle bei Jungtieren als nicht-leukotisch abweisen würde.

Rinder werden am häufigsten von lymphatischer Leukose befallen (*Lund*); myeloische Leukose hingegen ist selten, doch sind solche Fälle beschrieben worden (*L. Lund, Nieberle, L. P. de Wries, J. Howard Jones*). Es ist indessen zweifelhaft, ob überhaupt echte myeloische Leukose beim Vieh vorkommt; denn das Blutbild derselben ist niemals beobachtet worden. Die Diagnose wurde immer nur durch histologische Untersuchungen gesichert (*Jarmai*). *Andreiff* glaubt, einen Fall von Lymphogranulomatose beim Rinde beobachtet zu haben. Die Diagnose ist jedoch wahrscheinlich falsch, da die für die Lymphogranulomatose charakteristischen histologischen Veränderungen fehlten (*Jarmai, Juraschke, Lukes, Nieberle, Wirth*). Lymphosarkomatose ist beim Rinde verbreitet. Sie nimmt in der Regel ihren Ausgang von der Wand des Labmagens oder der vor-

dersten Darmabschnitte und greift von hier aus mit malignem aggressivem Wachstum auf Nachbarorgane und -gewebe über (Feldmann).

Die Lymphozytomatose wird durch eine mächtige Vergrößerung aller oder fast aller Lymphknoten gekennzeichnet (Knuth & Volkmann). Ursprünglich wurde angenommen, dass Leber, Milz und Knochenmark sich nicht an den pathologischen Veränderungen beteiligten. Spätere Untersuchungen (Wittstock, Töllner, Lengwath, Totzek, Zumpfe & Lommatzsch) haben jedoch ergeben, dass diese Organe, selbst wenn sie makroskopisch anscheinend unverändert sind, doch mikroskopische Veränderungen aufweisen. Solche sind übrigens in den meisten Organen und Geweben nachgewiesen worden.

Eigene Untersuchungen.

Untersuchungsmaterial und Technik.

Im ganzen wurden 11 Fälle von generalisierter Lymphadenose beim Rind untersucht. Soweit möglich wurden bei den lebenden Tieren Blutuntersuchungen vorgenommen. Die Ergebnisse derselben sind in Tabelle 1 wiedergegeben und ihre Beschreibung im 1. Kapitel. Die Untersuchungen wurden im übrigen wie gewöhnliche Obduktionen ausgeführt. Die histologischen Untersuchungen wurden an Präparaten vorgenommen, die in Zenker-Formol fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin-Eosin, nach van Gieson, nach Maximow und ad modum Foot gefärbt waren. Wegen der Gleichförmigkeit der Obduktionsresultate werden diese tabellarisch in Tabelle 2 wiedergegeben, ebenso wie die makroskopischen und mikroskopischen Beschreibungen der Kürze halber in zusammengefasster Form aufgeführt werden.

Ergebnisse der Untersuchungen.

Mit Ausnahme eines 5 Monate alten Kalbes (S 1) und einer 2 Jahre alten Färse (L 2) waren die untersuchten Tiere von 5 bis 8 Jahre alt. Die Erkrankung war bei den lebenden Tieren durch eine mächtige Vergrößerung aller oder fast aller zugänglicher Lymphknoten, gradweise zunehmende Abmagerung und schliesslich Tod gekennzeichnet. Die Obduktionsfunde wurden von der gewaltigen Vergrößerung der Lymphknoten beherrscht, welche, wie Tabelle 2 zeigt, fast alle

Tabelle 2.

Makroskopischer Obduktionsbefund.

Falls Veränderungen nachgewiesen wurden, ist ein + eingezeichnet. Bei T 1, S 1, E 3 und R 2 handelt es sich um eingesandte Präparate, weshalb die Kennzeichnung der nachgewiesenen Veränderungen sich hier auf eigene Beobachtungen in Verbindung mit den Auskünften des Einsenders stützt.

Laufnr.	E1	E2	E3	O1	O2	T1	L1	L2	R1	R2	S1
Ln. submandibularis	+	+	+	+	+			+	+	+	
Ln. parotideus	+	+	+					+	+	+	
Tonsillen	+		+					+		+	
Ln. retropharyng. lateral.		+			+			+	+		
» » medial.	+	+			+			+	+		
» cervical. superficial.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lnn. sternales	+			+	+			+	+		
» bronchial.	+	+	+	+	+			+	+		
Ln. mediastinal. caudal.	+	+	+	+	+			+	+	+	+
Lnn. hepatici	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
» gastrici	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
» mesenterici		+	+	+	+		+	+	+	+	
» lumbales	+	+	+	+	+		+	+	+	+	
Ln. hypogastric.	+	+	+	+	+		+	+	+	+	
» iliac. medial.	+	+	+	+	+		+	+	+	+	
» inguinal. profund.	+	+	+	+	+		+	+	+	+	
Lnn. supramammaric.	+	+	+	+			+	+	+	+	
Ln. subiliac.	+	+	+	+	+		+	+	+	+	
Lnn. poplitei	+	+		+	+			+	+		
Herz			+	+	+		+				
Lunge											
Pleura											
Perikard											
Netzmagen			+	+	+				+		
Labmagen			+	+					+		
Duodenum			+						+		
Uterus			+	+	+				+		
Ovar				+					+		
Milz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Peritoneum								+			
Muskulatur					+						
Nieren	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leber	+	+	+	+	+	+	+		+		+
Knochenmark		+						+			+

Lymphknoten umfassen konnte. Die Lymphknotenvergrößerung konnte einen mächtigen Umfang annehmen. Beispielsweise sei angeführt: Ln. cervicalis superficialis, Lnn. supramammarii und Ln. inguinalis profundus konnten die Grösse eines Kinderkopfes erreichen, Ln. submandibularis und parotideus Apfelgrösse; Lnn. mesenterici konnten einen Strang von der Dicke eines Kinderarmes bilden, Ln. mediastinalis caudalis konnte so gross sein wie ein kleines Brot. Die vergrösserten Lymphknoten (Ln. inguinalis profundus, iliacus medialis und Lnn. lumbales — oder Lnn. gastrici und hepatici) bildeten oft grosse knotige Konglomerate. Die Kapsel der Lymphknoten war in der Regel makroskopisch unverändert, und die Lymphknoten waren gegenüber dem umgebenden Gewebe frei beweglich. Nur in einem einzigen Falle (O 2) war die Kapsel zerstört. Bei einem Lumballymphknoten liess sich keine Kapsel nachweisen, und die Grenze zwischen dem Parenchym des Lymphknotens und dem angrenzenden Muskelgewebe war verwischt. Die vergrösserten Lymphknoten waren gespannt fluktuierend, die Schnittflächen gelblichweiss, sehr feucht, über die Schnittländer hinausquellend. Auf den Schnittflächen fanden sich Hämorrhagien und Nekrosen von verschiedener Grösse und Form vor.

Die Milz war mit Ausnahme von S 1 vergrössert. Die kleinsten vergrösserten Milzen waren $1\frac{1}{2}$, die grössten 6—8 mal so gross wie gesunde Kuhmilzen. Die vergrösserten Milzen hatten abgerundete Ränder, die Kapseln waren unverändert, die Schnittfläche dunkelrot bis schwarzrot. Die Malpighischen Körperchen waren vergrössert und dicht gelagert, nur durch schmale Streifen rote Pulpa getrennt. In einem Falle (T 1) kamen in der Pulpa verstreut unregelmässig knotenförmige, gelbliche, nekrotische Bezirke von Erbsen- bis Nussgrösse vor. Die veränderten Milzen waren mürbe.

Die Leber war mit Ausnahme von R 1, L 2 und T 1 vergrössert; bei einigen der Tiere war sie bis 3—4 mal so gross als bei gesunden Tieren. Die vergrösserten Lebern hatten runde Ränder. Die Oberfläche, Kapsel und Farbe war unverändert. Die Farbe der Schnittfläche war bei L 1 und R 1

gelbbraun, bei den übrigen unverändert. Bei E 1, O 1, T 1 und S 1 fanden sich Knoten von Hirsekorn- bis Walnussgrösse vor. Sie waren von festerer Konsistenz als normales Lebergewebe. Die übrigen Tiere hatten keine Knotenbildung in der Leber. Die Knoten waren bei O 1 und E 1 scharf begrenzt, ohne dass sich jedoch irgendwelche Kapselbildung nachweisen liess. Bei T 1 und S 1 waren die Grenzen zwischen dem Gewebe der Knoten und dem Lebergewebe verfliessend. Das pathologische Gewebe infiltrierte hier das angrenzende Lebergewebe. In den grössten Knoten gab es Nekrosen und Hämorrhagien.

Die Veränderungen des Herzens waren hauptsächlich auf die Vorkammerwände beschränkt. Diese konnten bis zu 5 cm dicke, rötlichweisse, speckige Gewebsmassen sein. Bei O 2 fand sich in der rechten Vorkammer ein kirschgrosser Bezirk, der aus dem gleichen Gewebe bestand wie das, welches die Vorkammerwände bei den anderen Tieren bildete. Der pathologisch umgebildete Bezirk in der Vorkammerwand hatte keine scharfen Grenzen. Bei L 1 kamen ausser in der Vorkammerwand zugleich auch Veränderungen in der Herzkammerwand vor. Es handelte sich um einen walnussgrossen Bezirk in der linken Herzkammer, in der sich subendokardial ein Gewebe von der genannten Beschaffenheit vorfand, welches sich ohne scharfe Grenzen in das anscheinend unveränderte umgebende Gewebe verlor.

In den Nieren wurden bei allen Tieren knotenförmige, grauweisse Veränderungen in der Rindensubstanz nachgewiesen.

Die veränderten Uteri hatten bis zu 8 cm dicke Wände, welche stellenweise knotenförmige Verdickungen aufwiesen. Das veränderte Gewebe war speckig, gelblichrot.

Die veränderten Eierstöcke waren bis zu hühnereigross und bestanden aus einem gelblichweissen, speckigen Gewebe.

Die veränderten Wände des Netz- und Labmagens waren bis zu 5 cm dick, die des Dünndarms bis zu 2 cm. Sie bestanden aus einem gelblichweissen, speckigen Gewebe.

In den Fällen, in denen das Knochenmark verändert war,

fand sich in der ganzen Markhöhle des Humerus ein grau-rotes, mürbes Gewebe.

Histologische Veränderungen.

Die Struktur der Lymphknoten war bei allen Tieren total verändert. In den Schnitten kam nur ein sehr zellenreiches Gewebe ohne sekundäre Follikel vor. Die Trabekel konnten stets — oft freilich nur als spärliche zellinfiltrierte Reste — nachgewiesen werden. Die Kapsel war bei einzelnen Tieren unverändert, bei den übrigen mehr oder weniger zellinfiltriert. Das perikapsuläre Bindegewebe war in der Regel unverändert; doch bei L 1 und O 2 war es kräftig zellinfiltriert. In den Schnitten kamen grössere und kleinere, unregelmässig geformte, nekrotische und hämorrhagische Bezirke vor.

Bei stärkerer Vergrösserung sah man in einem spärlichen Stroma ein buntes Bild von zahlreichen Zellen in retikulär-synzytialer Verbindung. Die Zellen waren von 2—3 bis zu 6—8mal so gross als gewöhnliche Lymphozyten. Die grossen, blasenförmigen, chromatinarmen, runden, ovalen oder nierenförmigen Zellkerne enthielten in der Regel einen oder zwei relativ grosse Nukleoli. Das spärliche Chromatin war in der Form kleiner Granuli über den ganzen Kern verstreut. Es zeigte keine Neigung zur Anhäufung entlang der glatten, distinkten und dünnen Kernmembran. Das Protoplasma war gross, unregelmässig geformt und mit Ausläufern versehen, welche mit solchen aus den Nachbarzellen anastomosierten oder mit den Fibrillen des spärlichen Stromas verbunden waren. Das Stroma wurde von einem weitmaschigen Netz zarter argyrophiler Fibrillen dargestellt, die innig mit dem Protoplasma der Zellen verbunden waren. Zwischen den sessilen Zellen fanden sich freiliegende runde Zellen vom gleichen Typ wie diese. Verstreutliegende einzelne Lymphozyten kamen hier und da zwischen den pathologischen Zellen vor. Die pathologischen Zellen zeigten oft Mitosen. Sie bildeten Zellenzüge, die in grösserem oder geringerem Masse die Schnitte durchwebten; bei E 1 und S 1 wurden sie von klei-

nen Lymphozytenzügen begrenzt. Bei den übrigen Tieren fehlten grössere Anhäufungen von Lymphozyten, da diese hier nur einzeln oder in sehr kleinen Häufchen auftraten. Die Lymphozyten unterschieden sich durch ihre Grösse und ihre sehr chromatinreichen Kerne deutlich von den erwähnten pathologischen Zellen; ausserdem waren sie nie mit den argyrophilen Fibrillen verbunden. Es wurden keine Riesenzellen in den untersuchten Schnitten nachgewiesen. Die Infiltrationen der Kapseln, der Trabekel und des perikapsulären Bindegewebes wurden von Zellen des gleichen Typus wie die beschriebenen pathologischen Zellen gebildet. Sie bildeten wie diese retikulär-synzytiale Verbindungen. Kollagene Fibrillen vermisste man in den veränderten Bezirken des lymphatischen Parenchyms. Dagegen kamen sie im pathologischen Gewebe vor, das in ursprünglich kollagene Fibrillen enthaltendem Gewebe (Trabekel, Kapsel) auftrat. In dem pathologischen Gewebe wurden nur wenige dünnwandige Blutgefässe nachgewiesen.

Die Milzstruktur war, abgesehen von einer Vergrösserung der Malpighischen Körperchen, bei 10 der Tiere unverändert. Bei E 2 war das gewöhnliche Milzbild von einem einförmigen zellenreichen Gewebe ohne die übliche Scheidung in follikuläres und interfollikuläres Gewebe ersetzt. Trabekel und Kapsel waren anscheinend — mit Ausnahme von E 2 — unverändert. Bei E 2 fanden sich nur spärliche Reste des Trabekelsystems vor. Die Pulpa war zellenreicher als normal; es fanden sich in ihr Zellen vom Typ der pathologischen Zellen der Lymphknoten, und sie bildeten wie diese eine retikulär-synzytiale Zellengemeinschaft. In der Pulpa bildeten die Zellen grössere Haufen und waren häufig schalenförmig um die Malpighischen Körperchen angehäuft. Die Lymphozyten und die pathologischen Zellen kontrastierten infolge ihrer verschiedenen Morphologie scharf miteinander. Die Vergrösserung der Malpighischen Körperchen war auf die erwähnte Anhäufung von pathologischen Zellen zurückzuführen. Bei E 2 war das Milzgewebe überall von einem Gewebe ersetzt, das aus Zellen vom Typ der pathologischen Zellen der Lymphknoten bestand;

von den Trabekeln sah man nur spärliche, mit pathologischen Zellen infiltrierte Reste. Die pathologischen Zellen zeigten in allen Schnitten oft Mitosen. Argyrophile Fibrillen gab es nur in spärlicher Zahl. Kollagene Fibrillen kamen nur in den infiltrierten Trabekeln vor.

Die Leber wies nur stellenweise Veränderungen in der Form mehr oder weniger umfangreicher Zellanhäufungen auf. Hämorrhagien waren in den veränderten Bezirken allgemein verbreitet. Die Zellhaufen waren stets ohne Kapselbildung. Von den Infiltraten gingen Zellstränge aus, die die angrenzenden Leberzellbalken verdrängten und eine Leberzellenatrophie verursachten. Bei einigen Tieren (E 1, O 1, T 1 und L 2) kamen die Infiltrationen nur in dem interlobulären Bindegewebe vor, bei anderen (E 2, O 2, L 1, R 1, R 2 und S 1) zugleich auch in dem intralobulären und um die V. centralis herum. Die Zellhaufen bestanden aus Zellen vom Typ der pathologischen Zellen der Lymphknoten. In der Peripherie der Haufen sah man, dass die pathologischen Zellen direkt in die Kupfferschen Zellen fortsetzten, mit welchen sie verbunden waren.

Im interstitiellen Bindegewebe der Nieren gab es Anhäufungen des beschriebenen pathologischen Zelltyps. Die Haufen zeigten nie Kapselbildung.

Das Knochenmark bestand bei E 2 und L 2 aus einem Gewebe, das identisch mit dem pathologischen Gewebe der Lymphknoten war, und in welchem hier und da kleine Häufchen granulocytopoietischen und erythropoietischen Gewebes vorkamen. Bei den übrigen Tieren sah man nur Fettmark.

Bei O 1, O 2 und R 1 war die ganze Uteruswand — doch mit Ausnahme der Mukosa — mit Zellen vom Typus der pathologischen Zellen der Lymphknoten infiltriert.

Das interstitielle Bindegewebe des Herzens war bei O 1, O 2, L 1 und R 1 mit dem erwähnten pathologischen Zelltyp infiltriert. In entsprechender Weise war das interstitielle Bindegewebe des Netzmagens, des Labmagens und des Dünndarms von der Submukosa bis zur Subserosa infiltriert.

Diskussion:

Bei Berücksichtigung des gegenseitigen Verhältnisses zwischen Leukose und Lymphosarkomatose kann, wie *Apitz* hervorhebt, kein Zweifel darüber bestehen, dass die beiden Krankheiten eine nosologische Einheit bilden. Diese differentialdiagnostische Frage kann daher übergangen werden. Es muss genügen anzuführen, dass die histologischen Untersuchungen erwiesen haben, dass die pathologischen Formationen an den verschiedensten Lokalisationen im Organismus aus einem primitiven mesenchymalen Gewebe bestehen.

Die Beschreibungen zeigen, dass die klinischen und hämatologischen Symptome der Krankheit, ihr Verlauf und der Sektionsbefund *bei den untersuchten Kühen vollständig identisch mit den Veränderungen bei deutschen von der sog. Lymphozytomatose angegriffenen Rindern sind. Klinisch wird das Krankheitsbild in beiden Fällen von der starken, oft generalisierten Vergrösserung der Lymphknoten beherrscht; hämatologisch gibt es in beiden Fällen die gleichen pathologischen mononukleären Zellen, und schliesslich werden die histologischen Veränderungen in beiden Fällen durch Neubildung eines primitiven mesenchymalen Gewebes in den veränderten Organen gekennzeichnet.* Vergleicht man *Knuth* und *Volkmann's* erste Beschreibungen der pathologischen Blutzellen mit meiner Beschreibung derselben, so zeigt sich, dass die pathologischen Zellformen der Rinderlymphozytomatose völlig identisch mit den pathologischen Zellen bei dänischen Rindern sind. Das histologische Bild des pathologischen Gewebes ist ebenfalls völlig identisch mit *Dobberstein & Paarmann's* Beschreibungen der Histologie des pathologischen Gewebes bei der Lymphozytomatose. Die letzteren Forscher heben hervor, dass die Veränderungen ihren Ausgang nicht von den Keimzentren des lymphatischen Gewebes nehmen, sondern vielmehr vom Gewebe der Markstränge. Sie heben weiterhin hervor, dass die Milzveränderungen im roten Pulpagewebe auftreten, welches zellenreicher als normal ist. Die Zellen der roten Pulpa sind bei lymphozytomatösen Rindern hauptsächlich lymphoide Zellen und Retikulumzellen, wäh-

rend Lymphozyten, rote Blutkörperchen und Granulozyten nur in spärlicher Menge auftreten. Hieraus ergibt sich, dass die Veränderungen bei den von mir untersuchten dänischen Kühen im Prinzip auf die gleichen histologischen Veränderungen zurückzuführen sind, wie sie die Lymphozytomatose beim deutschen Rinde charakterisieren. *Dobberstein & Paarmann* glauben, dass das pathologische Gewebe der Rinderlymphozytomatose sich aus postfötal persistierenden embryonalen mesenchymalen Gewebsresten entwickle. *Das pathologische Gewebe bei den von mir untersuchten dänischen Kühen ist ein primitives juveniles mesenchymales Gewebe.* Die angeführten Punkte dürften als Beweis dafür genügen, dass die beschriebene Erkrankung bei dänischen Kühen mit der sog. *Lymphozytomatose bei deutschen Rindern identisch ist.*

Die Histologie des pathologischen Gewebes zeigt grosse Ähnlichkeit mit der menschlichen Lymphogranulomatose. Es darf jedoch nicht übersehen werden, dass die Diagnose Lymphogranulomatose mit dem Nachweis typischer *Sternbergscher* Zellen steht und fällt. Die Beschreibungen der histologischen Veränderungen bei dieser Krankheit erweisen indessen, dass keine *Sternbergschen* Zellen nachgewiesen sind, weshalb das Leiden *nicht* mit der menschlichen Lymphogranulomatose identifiziert werden kann.

Die histologischen Untersuchungen ergeben, dass es sich wahrscheinlich um neoplastische und nicht um hyperplastische Neubildungen handelt. Die Richtigkeit dieser Auffassung hängt jedoch davon ab, dass die Veränderungen irreversibel sind, d. h. dass sie nicht von einem ständig wirkenden chemischen oder infektiösen Agens bedingt sind. Die histologischen Untersuchungen können indessen keinen Aufschluss darüber geben, inwieweit die pathologischen Prozesse einerseits autonome, nicht reaktiv bedingte Neubildungen darstellen, oder ob sie andererseits reaktiv bedingte Proliferationen repräsentieren; auch bilden die bisher vorliegenden Untersuchungen der Krankheit eine zu unzureichende Grundlage für eine Entscheidung darüber, ob die Zellneubildungen ausserstande sind, sich dem Gesamtplane des Organismus anzu-

passen, sowie darüber, inwieweit eine eventuelle Umstellung irreversibel ist oder nicht. Die Auffassung von der neoplastischen Natur der Veränderungen stützt sich einerseits auf den Krankheitsverlauf, andererseits darauf, dass es bisher nicht gelungen ist, eine spezifische Ursache der Erkrankung nachzuweisen, obschon *Dobberstein* und Mitarbeiter im Serum von Tieren mit Lymphozytomatose ein anämisierendes Agens nachgewiesen haben, welches möglicherweise in Verbindung zur Krankheitsursache steht.

Die pathologischen Veränderungen der Rinderlymphozytomatose werden, wie die obigen Beschreibungen zeigen, gekennzeichnet von:

1. den pathologischen Zellen,
2. der Verbindung derselben mit zarten argyrophilen Fibrillen,
3. einem spärlichen Stroma.

Die Morphologie der Zellen, die Verbindung derselben mit den argyrophilen Fibrillen und ihr Verhältnis zu den *Kupffer-schen* Leberzellen zeigen, dass sie entweder identisch mit den Zellen des retikulo-endothelialen Systems (*Aschoff*, *Kiyono*) sein oder ein primitives Entwicklungsstadium derselben darstellen müssen. Es geht unmittelbar aus den Beschreibungen hervor, dass es viele Ähnlichkeiten zwischen den Zellen dieses Systems und den pathologischen Zellen der Rinderlymphozytomatose gibt. Doch konnten *Dobberstein & Paarmann* die pathologischen Zellen nicht mit Karmin vitalfärben. Sie nehmen indessen an, dass die Zellen mit denen des retikulo-endothelialen Systems gleichgestellt werden müssen, weil die fehlende Fähigkeit zur Vitalfärbung von besonderen Eigenschaften der pathologischen Zellen herrühren könne. Es sei in diesem Zusammenhange betont, dass damit, dass das pathologische Gewebe bei der Lymphozytomatose mit dem retikulo-endothelialen Gewebe des Organismus verglichen wird, nicht gesagt ist, dass es auf der gleichen Entwicklungsstufe steht oder sich im gleichen funktionellen Zustand befindet wie das letztere. Die Untersuchungen erweisen, dass das Gewebe der Rinderlymphozytomatose histologisch und

zytologisch eine grosse Ähnlichkeit mit *Oberling's* differenzierten Retikulosarkomen s. *Benecke's* Retikulosarkomen s. *Roulet's* Retothelsarkomen zeigt, insbesondere mit der von *de Oliveira* als fibrillo-retikulo-synzytiale Retothelsarkome bezeichneten Unterabteilung derselben; denn wie bei diesen bilden die Retothelien der Lymphknoten den wichtigsten Elementarbestandteil des pathologischen Gewebes. *Ahlstrom* nennt solche Tumoren Retikelsarkome.

Der Formenreichtum der Zellen, die Zahl der Mitosen und die Metastasenbildung deuten eine sarkomatöse Wachstumstendenz an. Doch muss man möglicherweise auf Grund des Umstandes, dass das pathologische Gewebe nur ausnahmsweise normale Gewebsgrenzen überschreitet, sich bezüglich der Diagnose Sarkomatose etwas Zurückhaltung auferlegen. Die Benennung prä-sarkomatös ist wahrscheinlich mehr bezeichnend, falls man in Übereinstimmung mit *Park's* Auffassung hierunter versteht, dass die Atypie der proliferierenden Zellen und die Zahl der Mitosen einen Wachstumsmodus mit Tendenz zur Überschreitung von Organ- und Gewebsgrenzen andeuten, welche Andeutung durch die Infiltrationen in den Lymphknotenkapseln und durch das in einzelnen Fällen (O 2) nachgewiesene, infiltrative und destruierende Wachstum noch verstärkt wird.

Der Ursprung des pathologischen Gewebes und der parablomatöse Charakter der pathologischen Prozesse erklären unmittelbar das Vorkommen von Blastomzellen im Blute. Denn das Muttergewebe des pathologischen Gewebes trägt die Anlage, Zellen ins Blut abzugeben, in sich. Es ist in diesem Zusammenhange von Interesse, daran zu erinnern, dass *Knuth & Volkmann* in ihrer ersten Mitteilung über die Lymphozytomatose sich dahin äusserten, dass die pathologischen Zellen des Blutes möglicherweise Blastomzellen seien. Die Systemaffektionen im retikulo-endothelialen System lassen sich freilich nur schwer unter einen bestimmten abgegrenzten Krankheitsbegriff bringen, da sie eine Zwischenstellung zwischen infektiösen Granulomen und echten Blastomen einnehmen, ebenso wie sie einerseits Ähnlichkeiten mit

leukämischen und aleukämischen Myelosen und Lymphadenosen sowie andererseits mit sarkomähnlichen Proliferationen im hämatologischen System aufweisen (*K. Hörshold*). Die endgültige Entscheidung der Frage hängt davon ab, ob die Geschwulstzellen eines autonomen Wachstums fähig sind.

Aus den Untersuchungen ergibt sich:

1. *Dass die bei dänischen Rindern auftretende, chronische, oft generalisierte Lymphadenose im Prinzip mit der bei deutschen Rindern vorkommenden sog. Lymphozytomatose identisch ist.*

2. *Die charakteristischen Veränderungen der Krankheit sind, wie von D o b b e r s t e i n und Mitarbeitern hervorgehoben wurde, eine oft systemartige Proliferation von primitivem mesenchymalem Gewebe in den Bezirken des retikulo-endothelialen Systems.*

3. *Die Neubildungen haben eine auffallende Ähnlichkeit mit gewissen malignen Neoplasmen beim Menschen, aus einem juvenilen mesenchymalen Gewebe aufgebauten sog. Retothel-sarkomen, und sie sind wie diese hauptsächlich an den lymphatischen Apparat des Organismus gebunden und besitzen eine ausgesprochene Metastasierungsfähigkeit.*

Ätiologische Untersuchungen.

Zahlreiche Untersuchungen über den normalen und den pathologischen Proteinstoffwechsel sind ausgeführt worden und haben Aufschlüsse über viele der hierhergehörigen Prozesse gegeben.

Siegmund wies nach, dass einige der Veränderungen, die bei Infektionskrankheiten des Menschen und der Tiere in den hämatopoietischen Organen auftreten, auf parenterale Verdauung von Proteinen zurückzuführen sind. Er fand, dass parenterale Protein-zufuhr eine Ausweitung des Gebietes des aktiven mesenchymalen Gewebes sowie eine Neubildung von hämatopoietischem Gewebe mit sich führt. Fernerhin wies er nach, dass parenterale Caseosan-injektionen lymphozytäre Proliferationen zur Folge haben können. Später sind diese Beobachtungen durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt worden. *Pentimalli* fand, dass chronische Proteinvergiftun-

gen bei Kaninchen von wichtigen Veränderungen in den hämatopoietischen Geweben begleitet werden können. Die Veränderungen hängen von der Art des Proteins und der individuellen Disposition des Tieres ab. Wenn diese Faktoren in derselben Richtung arbeiten, treten anatomische und hämatologische Bilder auf, welche sehr dem Bilde der lymphatischen Leukose ähneln, *ohne jedoch damit identisch zu sein*. Büngeler wies nach, dass Indol, abgesehen davon, dass es eine anämisierende Wirkung hat, durch ständige Einwirkung auf den tierischen Organismus Veränderungen von der Art der lymphatischen und myeloischen Leukose mit sich bringen kann. Charles Grégoire fand, dass eine einzige subkutane Injektion von Pferdeserum bei normergischen Meerschweinchen eine leichte Reaktion in dem lymphatischen Gewebe und dem Retikulumgewebe der regionären Lymphknoten zur Folge hatte. Bei sensibilisierten Tieren folgt auf die Reinjektion des Agens eine allgemeine Reaktion in den Lymphknoten des Organismus mit ödematöser Schwellung und Hyperplasie des lymphatischen lymphoiden Gewebes sowie des Retikulumgewebes. Vaubel fand nach wiederholten Injektionen von Pferdeserum ähnliche Milzveränderungen wie *Pentimalli*, und er erwähnt zugleich auch das Vorkommen von Riesenzellen in der Milz. Akaboshi sah nach intravenöser Injektion grosser Dosen Pferdeserum ausser lymphatischer Hyperplasie zugleich auch Vermehrung in der Zahl und Vergrösserung der Retikulumzellen sowie Vorkommen von »retikulären Riesenzellen« mit mehr als 50 Kernen. Die Veränderungen waren 4 Wochen nach dem Aufhören der Injektionen verschwunden. Apitz fand bei Kaninchen, die mit Pferdeserum sensibilisiert worden waren, dass die wesentlichsten Milzveränderungen in einer grosszelligen, von der Pulpa ausgehenden Proliferation bestanden. Die Veränderungen waren in leichteren Fällen auf die Pulpa beschränkt, umfassten aber in schwereren Fällen auch die Follikel. Die grossen Zellen stellten primitive mesenchymale Zellen mit geringer funktioneller Differenzierung vor. E. Jeckelen fand ähnliche Veränderungen bei mit Pferdeserum sensibilisierten Kaninchen. Er erwähnt Riesenzellenbildung in der Milz sowie Umbildung der Keimzentren der Lymphknoten mit einer Vermehrung der retikulären Elemente derselben. Reinhold Knepper wies nach, dass allergische Gewebsveränderungen von thermischen und hormonalen Einwirkungen sowie von Autozytotoxinen beeinflusst werden, indem sie hierdurch auf bestimmte Gewebe beschränkt bleiben können.

Dobberstein & Paarmann nehmen an, dass die Lymphozytomatose des Rindes in ätiologischer Beziehung möglicherweise in Verbindung mit chronischen Proteinvergiftungen steht, indem eine solche eventuell eine latente Infektion mit einem unbekannten Virus

auslöse. Die Autoren weisen darauf hin, dass die Lymphozytomatose eine Kulturkrankheit sei, die ständig häufiger auftrete und dass sie bei Kühen am häufigsten vorkomme. Ihrer Ansicht nach stehen möglicherweise beide Punkte in Verbindung mit der ständig wachsenden Anwendung eiweissreicher Futtermittel für die hochergiebigen Milchrassen der Jetztzeit.

Auf der Grundlage der referierten Untersuchungen und Vermutungen habe ich die Reaktion der Rinder gegenüber chronischen Proteinvergiftungen unter wechselnden Versuchsbedingungen untersucht.

Die Versuche umfassten ursprünglich 20 Tiere, von welchen 10 mit Indol und 10 mit Magermilch geimpft wurden. Das Indol erwies sich indessen als besonders giftig, und die damit behandelten Tiere starben alle in einem frühen Versuchsstadium. Abgesehen von den gewöhnlichen toxischen Veränderungen wurde in dem hämatopoietischen System dieser Tiere nichts von Interesse nachgewiesen. Im folgenden ist daher nur die Rede von Tieren, die mit Magermilch behandelt wurden.

Die Versuchstiere.

Zu dem Versuch wurden 10 Mastkälber angewandt, die bei Versuchsbeginn von 95 bis 100 kg wogen. 5 der Tiere (A 5163, A 5164, A 5165, A 5170 und A 5171) waren Stiere, der Rest Färsen (A 5166, A 5167, A 5168, A 5169 und A 5172).

Der Gesundheitszustand der Tiere wurde vor Versuchsbeginn während einer 14 tägigen Beobachtungszeit kontrolliert. Sie wurden während der ganzen Versuchsperiode täglich untersucht. Hämatologische Untersuchungen wurden regelmässig einmal wöchentlich vorgenommen. Die Zahl der Leukozyten und Erythrozyten wurde nach *Thoma* bestimmt, die Hämoglobinnmenge nach *Sahli*. Die morphologische Untersuchung der zellulären Bestandteile des Blutes sowie die Differentialzählung wurden nach den gleichen Richtlinien, wie sie im ersten Abschnitt besprochen sind, vorgenommen.

Versuchsmethodik.

Jedes Versuchstier erhielt in den ersten 7 Tagen täglich 50 ccm, in den folgenden 2 Wochen täglich 100 ccm und in der übrigen Versuchszeit täglich 200 ccm Magermilch intravenös injiziert. Zwei Tiere (A 5165 und A 5170) bekamen ausserdem während der ganzen Versuchsperiode einmal wöchentlich eine in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Streptokokkenkultur intravenös injiziert. Diese Kultur wurde mir liebenswürdigerweise von Herrn Prof. *M. Christiansen*, Statens veterinære Serumlaboratorium, überlassen, der ebenfalls die Freundlichkeit hatte, die Bakterienaufschwemmungen herzustellen. Schliesslich wurde noch 2 Tieren (A 5164 und A 5172) zweimal wöchentlich Milzschässel von gesunden Tieren intraperitoneal eingespritzt. Diese Injektionen wurden in 2 aufeinander folgenden Wochen vorgenommen; jedes Mal wurden jedem Tier 20 ccm Milzschässel injiziert. Nach dem Schlachten wurden Knochenmark, Milz, Lymphknoten, Leber, Nieren und Herz histologisch untersucht. Die histologischen Untersuchungen wurden nach den gleichen Methoden wie bei den von Lymphozytomatose angegriffenen Tieren (s. d.) vorgenommen.

Zwei Tiere schieden aus den Versuchen aus, A 5167, das am 10. Versuchstage an Enteritis einging, und A 5169, das am 24. März an Phlebitis starb.

Versuchsergebnisse.

Abgesehen von den ersten 3 Wochen der Versuchsperiode, in denen die allgemein bekannten allergischen Schockphänomene auftraten, vertrugen die Tiere die Injektionen gut. Eine kurze Mattigkeitsperiode trat bei allen Versuchstieren während der ganzen Versuchsperiode im unmittelbaren Anschluss an die Injektionen auf. Die klinischen Symptome lassen sich wegen ihrer Gleichförmigkeit kurz und summarisch wiedergeben.

Klinische Symptome bei Tieren, die ausschliesslich mit intravenösen Injektionen von Magermilch behandelt wurden.

A 5163 war das einzige Versuchstier, das die ganze Ver-

suchsperiode überlebte. Dieses Tier bekam insgesamt 39950 ccm Magermilch intravenös; von den übrigen wurden 29750 ccm Magermilch bei A 5168, 26150 ccm bei A 5166 und 25350 ccm bei A 5171 injiziert.

Die allergischen Schockphänomene hörten im Verlaufe von 3 Wochen auf, als die Allergenzufuhr ihr Maximum mit 200 ccm täglich pr. Tier erreicht hatte. Bei allen Versuchstieren trat eine Vergrösserung der oberflächlichen, für die klinische Untersuchung zugänglichen Lymphknoten auf. Dieselbe wurde zuerst bei A 5163 und A 5168 drei Wochen nach Versuchsbeginn konstatiert, nahm in den folgenden Wochen an Umfang zu und erreichte ihr Maximum im Laufe von 18 und 20 Wochen, wonach eine allmähliche Verkleinerung der Lymphknoten bis zum Tode der Tiere wahrgenommen wurde. Die Lymphknoten waren bei A 5166, A 5168 und A 5171, als die Vergrösserung ihr Maximum erreicht hatte, mehr als doppelt so gross als bei gleichalterigen unbehandelten Kälbern. Bei A 5163 war Ln. subiliacus, als derselbe seinen grössten Umfang hatte, von der Grösse einer geballten Kinderfaust. Ausser der Vergrösserung der Lymphknoten wurde trotz guten Appetits eine ständig zunehmende Abmagerung bei den behandelten Tieren beobachtet.

Blutveränderungen.

Aus den Blutuntersuchungen geht hervor, dass die Erythrozytenzahl nach verschiedenen Unregelmässigkeiten in den ersten 5 bis 6 Wochen der Versuchsperiode einen allmählichen Fall aufweist, um schliesslich am Ende der Versuche nach 20 bis 25 Wochen ca. die Hälfte der Zahl bei Versuchsbeginn auszumachen. In den Ausstrichpräparaten wurde gleichzeitig eine Erhöhung der Zahl der kernhaltigen roten Blutkörperchen nachgewiesen. Dieselben kommen nur ausnahmsweise bei gleichalterigen unbehandelten Kälbern vor. Sie traten im letzten Teil der Versuchsperiode in einer Anzahl von 2 oder mehr pr. 100 Leukozyten bei den Versuchstieren auf, wobei gleichzeitig Anisozytose und Polychromasie beobachtet wurde.

Die Hämoglobinmenge verhielt sich wie die Erythrozytenzahl.

In den ersten 2 bis 3 Versuchswochen war die Leukozytenzahl erhöht. Dann folgte ein kurzer Fall, der wiederum von einer 4 bis 6 Wochen dauernden Erhöhung der Leukozytenzahl abgelöst wurde. Diese zweite Erhöhung der Zahl war grösser als die erste, und sie wurde von einem neuen 3 bis 5 Wochen dauernden Fall abgelöst, worauf schliesslich eine gradweise Vermehrung der Leukozytenzahl eintrat. Die grösste Anzahl Leukozyten fand sich am 3. Mai bei A 5163. Sie war mit 47000 4—5 mal so gross als die Normalzahl für Rinder. Bei den übrigen 3 Tieren kamen die höchsten Leukozytenwerte am 16. Mai (A 5166), am 13. April (A 5168) und am 28. März (A 5171) vor. Aus den Resultaten der Differentialzählung geht hervor, dass die Lymphozyten das Blutbild beherrschen. Ihre Anzahl war in den Wochen der stärksten Erhöhung der Leukozytenzahl bis zum Vierfachen des Normalen vermehrt. Die gleichzeitig auftretende Erhöhung der absoluten Zahl der Neutrophilen war beträchtlich geringer. Bei A 5168 und A 5163 kam es infolge von Injektionsfehlern zu Abszessbildungen; doch war trotzdem die Neutrophilenzahl niemals so stark erhöht wie die der Lymphozyten. Lymphoblasten traten nur in bescheidener Anzahl auf.

Nach dem 1. März fanden sich unter den lymphatischen Zellen zahlreiche pathologische Zelltypen (Riederzellen, »Reizformen«) und zugleich war die Anzahl der jugendlichen Lymphozyten gross, ebenso wie einzelne typische Lymphoblasten nachgewiesen wurden. Wegen der zahlreichen oft sehr jugendlichen Lymphozyten waren die Grenzen zwischen Lymphoblasten und Lymphozyten verwischt. Jedes Reifungsphänomen führte mit sich, dass die Zellen als Lymphozyten bezeichnet wurden.

Obduktionsbefunde.

Die Sektionsfunde waren sehr gleichmässig. Bei A 5166 und A 5171 waren die Lnn. cervicales superficiales doppelt

so gross als bei gleichalterigen gesunden Tieren, bei A 5163 und A 5168 waren sie $1\frac{1}{2}$ mal so gross. Lnn. hepatici waren bei A 5171 doppelt so gross als normal, bei A 5166 wie ein kleines Hühnerei; bei den beiden anderen Tieren waren sie von normaler Grösse. Ln. mediastinalis caudalis war bei A 5171 $15 \times 6 \times 4$ cm, bei A 5166 $22 \times 9 \times 5$ cm, bei A 5163 $12 \times 5 \times 4$ cm und bei A 5168 $10 \times 4 \times 3$ cm. Die Milz war bei A 5171 $1\frac{1}{2}$ mal so gross als bei gleichalterigen gesunden Tieren, während sie bei den übrigen Versuchstieren normale Grösse hatte. Die Milzränder waren bei allen Tieren abgerundet. Die Schnittfläche wurde von mehr als stecknadelkopfgrossen grauweissen Körperchen beherrscht, die durch schmale Züge roter Milzpulpa getrennt waren. Makroskopisch wurden keine pathologischen Veränderungen in Lungen, Herz und Leber nachgewiesen. In den Nieren kamen bei allen Tieren miliare bis supermiliare graue Fozi vor. Das Knochenmark im Humerus war bei allen Tieren hauptsächlich inaktives gelbes Fettmark; aktives rotes Knochenmark gab es nur als einen schmalen Saum längs der Ränder und in der proximalen Epiphyse.

Histologische Untersuchungen.

A 5166 und A 5171.

Lymphknoten.

Bei schwacher Vergrösserung sah man, dass das Gewebe viel zellärmer als normal war. Sekundäre Follikel kamen in spärlicherer Zahl vor als bei gesunden Tieren. Grosse Bezirke der Schnitte bestanden aus einem äusserst zellarmen retikulären Gewebe, in dem man jegliche Andeutung von sekundären Follikeln vermisste. Kapsel, Trabekel und grössere Gefässe waren anscheinend unverändert.

Bei stärkerer Vergrösserung ergab sich in den zellenreicheren Parenchymbezirken ein nahezu normales Bild, das jedoch weniger zellenreich als normal war. Die verschiedenen Gewebselemente waren deutlicher geschieden als normal. Die Mehrzahl der Zellen waren typische Lymphozyten; fernerhin

war die Zahl der *Marschalko-Judasonschen* Plasmazellen gross. Dieselben fanden sich in der Regel in kleinen Häufchen vor. Die Retikulumzellen waren infolge von Hypertrophie und der geringeren Zellhaltigkeit des Gewebes deutlicher als in normalem lymphatischem Gewebe. Sie kamen entweder einzeln oder in kleinen Häufchen gesammelt vor. Ausser den angeführten Zellen gab es einzeln oder verstreut grössere lymphatische Zellen vom Typus der sog. Lymphoblasten. Mitosen waren selten. In den sekundären Follikeln sah man bei gesunden Tieren zahlreiche Lymphozyten. In den wenigen Fällen, in denen es germinative Zentren gab, waren dieselben vom gleichen Zelltypus gebildet wie bei gesunden Tieren. Zellen mit degenerativen Kernveränderungen waren zahlreich und ins Auge fallend. Sie kamen sowohl innerhalb als auch ausserhalb der sekundären Follikel vor.

In den zellarmen Parenchymbezirken sah man bei schwacher Vergrösserung ein typisches retikuläres Gewebe, in dem die Retikulumzellen die am meisten ins Auge fallende Zellart bildeten. Dieselben waren in der Regel hypertrophiert. Das Protoplasma der einzelnen Zellen anastomosierte mit dem der Nachbarzellen. Zerstreut zwischen den Retikulumzellen fanden sich Lymphozyten und Plasmazellen in spärlicher Anzahl. Das Gewebe wurde ausserdem durch die in grosser Anzahl vorkommenden vaskulären Elemente gekennzeichnet. Die Gefässe waren hauptsächlich mit Lymphozyten gefüllte Lymphgefässe. Kleine Blutgefässe kamen nur in geringer Zahl vor. In silberimprägnierten Präparaten zeigte sich eine deutliche und intime Verbindung zwischen den Retikulumzellen und einem zarten Netzwerk von versilberten Fibrillen. Die Retikulumzellen schienen dagegen keine fuchsinophilen Fibrillen zu bilden. Hier und da sah man Retikulumzellen in Mitose. Degenerierte Zellen traten ebenso wie in den zellenreicheren Bezirken in grosser Anzahl auf. Das Gewebe erinnerte an juveniles Granulationsgewebe.

Die Endothelzellen der Lymph- und Blutkapillaren konnten unverändert sein; aber hin und wieder sah man doch einzelne hypertrophierte Endothelzellen in den kleinen

lymphatischen Gefässen. In den zellarmen Parenchymgebieten gab es hier und da um kleine Arteriolen herum geringere Anhäufungen von Lymphozyten und Retikulumzellen. Die Kapsel und die Trabekel waren unverändert. Die grösseren Gefässe waren in der Regel unverändert, aber mitunter kamen kleinere Infiltrationen von aktivierten Mesenchymzellen in ihrem adventitiellen Bindegewebe vor.

Die Milzstruktur war unverändert. Die Malpighischen Körperchen waren in der Regel scharf konturiert. Die grösseren Blutgefässe verhielten sich wie in den Lymphknoten. Die rote Pulpa war relativ zellarm. Die Mehrzahl ihrer Zellen waren Lymphozyten, Plasmazellen traten in grösserer Anzahl als normal auf; sie waren oft in kleinen Häufchen gesammelt. Die Retikulumzellen waren stellenweise unverändert, an anderen Stellen hypertrophisch. Die germinativen Zentren der Malpighischen Körperchen waren in der Regel schwach entwickelt oder fehlten ganz. Die ektatischen Blutkapillaren waren gefüllt mit lymphozytoiden Zellen. Die Sinusendothelien waren unverändert.

Das Knochenmark war sehr zellarm. Es bestand hauptsächlich aus Fettgewebe. Hier und da, besonders in den Randzonen, sah man kleine Häufchen hämatopoietischen Gewebes, welche von primitiven Zellen gebildet wurden und nur selten erythropoietisches Gewebe enthielten.

In Lungen und Herz gab es, abgesehen von Gefässveränderungen der gleichen Art wie in den Lymphknoten, nichts von Bedeutung für diese Untersuchungen.

Die Leberstruktur war unverändert. Die intraazinösen Kapillaren waren ektatisch, mit lymphozytoiden Zellen gefüllt. Die Kupfferschen Zellen und die Kapillarendothelien waren in der Regel hypertrophiert.

A 5163 und A 5168.

Die Lymphknoten verhielten sich im wesentlichen wie bei den beiden vorausgehenden Tieren. Doch wurden häufiger als bei diesen germinative Zentren nachgewiesen, die aus dem gleichen Zelltypus wie bei gesunden Tieren aufgebaut waren. In entsprechender Weise wich das Milzbild von dem bei

den beiden vorausgegangenen Tieren ab, indem es häufiger germinative Zentren in den Malpighischen Körperchen hatte. Knochenmark, Leber, Niere und Herz verhielten sich wie bei den zwei vorausgegangenen Tieren.

*Tiere, behandelt intravenös mit Magermilch und
intraperitoneal mit Milzbrei.*

A 5164 und A 5172.

Die Blutveränderungen verliefen nach den gleichen Prinzipien wie bei den ausschliesslich mit Magermilch intravenös behandelten Tieren. Die Leukozytenveränderungen waren ebenfalls analog denen bei den ausschliesslich mit Magermilch behandelten Tieren.

Die makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen waren wie bei den beiden am längsten lebenden Tieren der vorausgehenden Gruppe. In den lymphatischen Geweben fanden sich oft sekundäre Follikel mit vollentwickelten germinativen Zentren. Die zellarmen Parenchymgebiete der Lymphknoten waren kleiner als bei ausschliesslich mit Magermilch behandelten Tieren.

*Tiere, intravenös behandelt mit Magermilch und mit
Streptokokkenkulturaufschwemmung.*

A 5165 und A 5170.

Die hämatologischen Veränderungen waren von etwas anderer Art als bei den übrigen Versuchstieren. Der Unterschied gab sich in dem relativen Mengenverhältnis zwischen den verschiedenen Altersstufen der neutrophilen Granulozyten zu erkennen. Bei den oben besprochenen Versuchstieren fehlte die Linksverschiebung des neutrophilen Kernbildes; bei den Tieren dieser Gruppe trat dagegen eine deutliche Linksverschiebung des neutrophilen Kernbildes auf, die durch eine Vermehrung der Zahl der Stabkernigen charakterisiert war. Im übrigen fehlten nennenswerte Abweichungen im Blutbilde, verglichen mit den Verhältnissen bei den übrigen Versuchstieren.

Die klinischen Symptome und der Obduktionsbefund waren wie bei den oben besprochenen Versuchstieren. In Lymphknoten, Milz, Herz und Nieren gab es ähnliche histologische Veränderungen wie bei diesen, in Leber und Knochenmark waren die Veränderungen dagegen abweichend von den oben genannten Veränderungen.

Das Bild des Knochenmarks wurde bei A 5170 durch einen grösseren Zellenreichtum als bei den Tieren der anderen Versuchsgruppen gekennzeichnet. Das Auffälligste waren jedoch zahlreiche Häufchen von Zellen, die bei schwächerer Vergrösserung den Zellen in den sekundären Follikeln der Lymphknoten sehr ähnelten. Untersuchungen bei stärkerer Vergrösserung ergaben, dass die genannten Knochenmarkszellen sich nicht von den Zellen in den sekundären Follikeln der Lymphknoten unterscheiden liessen. Den Häufchen fehlte jegliche Andeutung von differenziertem myeloischem Gewebe.

Bei dem gleichen Tiere sah man in der Leber Infiltration des adventitiellen Gewebes der Gefässe, und ausserdem fanden sich mehrere intralobuläre Zellhaufen vor, die das Lebergewebe verdrängten. Die perivaskulären Infiltrationen erwiesen sich bei stärkerer Vergrösserung als aus Lymphozyten sowie aus aktivierten Mesenchymzellen bestehend. Die intralobulären Haufen setzten sich aus zahlreichen Rundzellen, polymorphkernigen Leukozyten und einigen Retikulumzellen zusammen. Sie waren alle extravaskulär zwischen den Leberzellen gelegen.

Diskussion der Versuchsergebnisse.

Intravenöse Injektion von Magermilch in grossen Mengen durch längere Zeit hindurch verursacht bei den Versuchskälbern eine heftige Anämie sowie Reduktion des erythropoietischen Gewebes des Knochenmarks. Diese Reaktion ändert sich nicht bei gleichzeitiger intravenöser Injektion getöteter, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmter Streptokokken oder bei intraperitonealen Injektionen von Milzbrei gesunder Kühe.

Die Leukozytenzahl des Blutes bewegt sich in wellenförmigen Kurven. Differentialzählung zeigt, dass die Mononukleose bei ausschliesslich mit Magermilch behandelten Tieren auf eine Erhöhung der Lymphozytenzahl im peripheren Blut zurückzuführen ist. Es traten zwar hin und wieder Polynukleosen bei den Tieren auf, aber diese liessen sich auf Impffehler zurückführen, bei welchen etwas von der injizierten Milch extravenös deponiert wurde und hier purulente Entzündungen verursachte. Die Polynukleosen waren von sehr kurzer Dauer und erschienen zu verschiedenen Zeitpunkten der Versuchsperiode. Sie hörten sofort nach der Spaltung der gebildeten Prozesse auf. *Die Mononukleose stellt die spezifische Reaktion gegenüber der Proteininjektion dar.* Die durch intravenöse Injektion von Magermilch hervorgerufene Lymphozytose wurde augenscheinlich nicht nenneswert von intraperitoneal injiziertem Milzbrei beeinflusst. Die kurzdauernden Polynukleosen bei diesen Tieren rührten von Abszessbildungen her und sie verschwanden, nachdem die unmittelbaren Folgen der Milzbreieinjektionen überwunden waren. Bei Tieren, die ausser mit Magermilch mit intravenösen Streptokokkeninjektionen behandelt wurden, verlief die Reaktion in abweichender Weise.

Unter den Lymphozyten gab es viele pathologische Zellen (Reizformen, Riederzellen) und die Anzahl der pathologischen Zellen konnte die der normalen überschreiten; fernerhin gab es viele jugendliche Lymphozyten. Es lässt sich auf Grund der Untersuchungsergebnisse feststellen, *dass intravenöse Injektion von Magermilch bei Kälbern eine toxische Lymphozytose hervorruft, welche indessen nicht mit derjenigen der lymphatischen Leukose gleichgestellt werden kann, weil der Hiatus leucaemicus (Naegeli) fehlt.*

Die klinischen Beobachtungen entsprechen den Befunden, die *Pentimalli* und *Grégoire* bei Reinjektion von Antigen bei sensibilisierten Versuchstieren gemacht haben, und sind durch eine Vergrösserung der oberflächlichen Lymphknoten in den ersten 20 Wochen der Versuchsperiode charakterisiert. Danach trat eine Verkleinerung der Lymphknoten ein. Die in-

interessantesten histologischen Veränderungen fanden sich in den Lymphknoten, wozu Veränderungen entsprechender Art in Milz, Knochenmark und Leber hinzukamen. Eventuelle Degenerationen in Leber und Nieren sind in diesem Zusammenhange ohne Interesse.

Die kräftigsten Veränderungen gab es bei den beiden zuerst eingegangenen Tieren. Bei den Tieren, die die ganze Versuchsperiode überlebten, war die Vergrößerung der Lymphknoten und Milz geringer, während Leber und Knochenmark sich wie bei den beiden zuerst eingegangenen Tieren verhielten. Die Veränderungen in Lymphknoten und Milz waren bei den Tieren aller Versuchsgruppen gleichartig.

In den lymphatischen Geweben konnten eine beträchtliche Verminderung der Zellenmenge sowie viele degenerierte Zellen festgestellt werden. Das lymphatische Parenchym der Lymphknoten war deutlich funktionell inaktiv in grossen Bezirken, Die herabgesetzte Funktion geht eindeutig aus der spärlichen Anzahl von Mitosen, den wenigen germinativen Zentren und den zellarmen Parenchymbezirken hervor. Die Reaktion zeigt, *dass intravenöse Injektion grosser Mengen Magermilch durch lange Zeit hindurch zu einer Leerung des lymphatischen Parenchyms von Lymphozyten führte.* Am 15. Februar 1941 wurden 4 Mastkälber in einem reinen Proteinversuch von der Art des geschilderten eingesetzt. Es war beabsichtigt, diese Tiere für einen Zeitraum von einem Jahr oder mehr im Versuch zu lassen. Doch musste derselbe infolge der Futtersituation am 1. August 1941 abgebrochen werden. Es fanden sich bei diesen 4 Tieren entsprechende hämatologische, klinische und anatomische Veränderungen wie bei den oben besprochenen Tieren vor. Dieser Versuch wird daher hier nicht näher referiert. Abgesehen von den bereits erwähnten Veränderungen gab es in den lymphatischen Geweben, dem Knochenmark und der Leber *eine ausgesprochene Proliferation der Zellen des retikulo-endothelialen Systems.* Die Proliferationen waren besonders ins Auge fallend in den zellarmen Bezirken der Lymphknoten. Diese Gebiete ähnelten stark frühen Entwicklungsstadien von me-

senchymalem Gewebe. Falls das Gewebe mit primitivem mesenchymalem Gewebe gleichgestellt werden kann, eröffnen sich hiermit unübersehbare Möglichkeiten für eine fortgesetzte Entwicklung bei länger dauernden Versuchen. Die Beschreibung der histologischen Reaktion zeigt, dass dieselbe nicht mit den histologischen Veränderungen bei Leukose oder damit verwandten Zuständen identifiziert werden kann. Die Reaktion ist dagegen identisch mit Grégoire's Beobachtungen bei allergischen Reaktionen in lymphatischem Gewebe. Die Abweichungen, die es zwischen Grégoire's, Pentimalli's und meinen Wahrnehmungen gibt, können davon herrühren, dass die beiden erstgenannten Autoren subkutane Antigeninjektionen anwandten, ich dagegen intravenöse. Es ist allgemein bekannt, dass der Injektionsweg bei Untersuchungen dieser Art einen entscheidenden Einfluss auf den Reaktionsverlauf haben kann.

Die Reaktion wurde, mit Ausnahme von A 5170, dadurch gekennzeichnet, dass das Knochenmark im Humerus zur Hauptsache aus Fettgewebe bestand. Bei A 5170 kamen dagegen zahlreiche lymphoide Zellhaufen im Humerusmark vor. Es ist bekannt, dass es kleinere Häufchen lymphatischen Gewebes im Knochenmark geben kann. Sie sind jedoch selten und klein und kommen wahrscheinlich niemals in so grossem Ausmasse vor wie bei diesem Tiere. Die Reaktion des lymphatischen Gewebes ist freilich, selbst wenn man die besondere Reaktion von A 5170 mitrechnet, ganz anderer Art als bei lymphatischer Leukose.

Die nachgewiesene kräftige Aktivierung der Elemente des retikuloendothelialen Systems in der Leber lässt sich nicht mit den Veränderungen bei den sog. Retikuloendotheliosen des Menschen vergleichen. Die intralobulären myeloischen Haufen bei A 5170 gleichen vollständig heteroplastischen myeloischen Gewebsneubildungen bei Infektionskrankheiten. Sie lassen sich dagegen nicht mit leukotischen Neubildungen gleichstellen. Die Reaktion bei diesem Tiere muss als das Ergebnis zweier verschiedener Ursachen aufgefasst werden, 1) einer kräftigen, von den Proteininjektionen hervorgerufe-

nen, lymphatischen Reaktion und 2) einer vikariierenden Reaktion für das insuffiziente Knochenmark, die wahrscheinlich von den Streptokokken hervorgerufen ist.

Die Ergebnisse der bis zu $\frac{1}{2}$ Jahr dauernden Injektionen von Magermilch bei Mastkälbern sind:

1. Eine kräftige Lymphozytose.
2. Degenerative Veränderungen in dem lymphatischen Parenchym.
3. Funktionelle Inaktivierung grosser Bezirke des lymphatischen Parenchyms zugleich mit dessen Umbildung zu einem jugendlich aussehenden retikulären Gewebe.
4. Verringerung der Funktion des myeloischen Gewebes.
5. Aktivierung der Elemente des retikulo-endothelialen Systems.
6. Die Veränderungen lassen sich nicht wie in Pentimalli's und Büngeler's Versuchen mit leukotischen Veränderungen vergleichen.
7. Die Versuche haben keine Anhaltspunkte dafür gegeben, dass chronische Proteinvergiftungen allein Leukose bei Rindern hervorrufen können. Das Vorkommen jugendlich aussehenden retikulären Gewebes in den Lymphknoten eröffnet jedoch die Möglichkeit einer fortgesetzten Entwicklung desselben auch in leukotischer Richtung.

Untersuchungen über die Möglichkeit der Übertragung von Rinderleukose.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei anderen Versuchstieren (Hühner, Mäuse) ist es bisher nicht möglich gewesen, Leukose von einer Kuh auf eine andere zu überführen, auch nicht wenn die Übertragung an homologen Tieren vorgenommen wird (Engelbreth-Holm & N. Plum). Dobberstein hat sich indessen dahingehend ausgesprochen, dass die Lymphozytomatose des Rindes möglicherweise auf ein unbekanntes Virus zurückzuführen sei, dessen Wirkung von einer chronischen Proteinvergiftung ausgelöst werde. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, habe ich bei Mastkälbern, die 4 bis 6 Wochen hindurch täglich intravenöse Injektionen von Ma-

germilch in der oben beschriebenen Weise erhalten hatten, intravenöse Injektionen vorgenommen von:

1. Serum von O 1 und R 1,
2. Pressaft der Lymphknoten von R 1,
3. Milzpressaft von R 1,

sowie bei nicht proteinbehandelten Tieren:

4. Subkutane Impfungen mit Schabsel der Lymphknoten von R 1.

Es geht aus den Versuchen mit Proteininjektionen hervor, dass die letzteren allein keine leukoseähnlichen Veränderungen bei den Versuchstieren zu erzeugen vermögen. Das eventuelle Auftreten von Leukose (Lymphozytomatose) bei einem Tier der drei ersten Gruppen muss daher, falls die 4. Versuchsgruppe negativ ausfällt, von einem Zusammenwirken zwischen der Proteinvergiftung und einem Virus in dem von den lymphozytomatösen Kühen stammenden Impfmateriale herrühren. Das Impfmateriale in den drei ersten Gruppen ist freilich nicht zellenfrei; es ist nur zellarm. In Anbetracht der Versuchsergebnisse ist das jedoch ohne Bedeutung.

Versuche mit Injektionen von Serum lymphozytomatöser Kühe bei proteinvergifteten Kälbern.

Zu den Versuchen wurden 4 Kälber von Alter und Grösse der in den reinen Proteinversuchen benutzten Kälber angewandt. Die Tiere waren, ehe sie intravenös mit Blutserum von lymphozytomatösen Kühen (O 1 und R 1) geimpft wurden, mit intravenösen Magermilchinjektionen 4½ Wochen lang in der gleichen Weise behandelt worden wie die Kälber in den reinen Proteinversuchen. Sie wurden dann, unter gleichzeitiger Fortsetzung der intravenösen Magermilchinjektionen, 2 Wochen lang zweimal wöchentlich mit jedesmal 250 ccm Serum der obengenannten Kühe intravenös geimpft. Die Kälber wurden hiernach 4½ Monate unter Beobachtung gehalten, in welchem Zeitraum wöchentlich klinische und monatlich hämatologische Untersuchungen vorgenommen wurden. Die Magermilchinjektionen hörten gleichzeitig mit den Serum-

jektionen auf. Die Reaktion verlief in der gleichen Weise wie bei den Kälbern, die ausschliesslich mit intravenösen Injektionen von Magermilch behandelt wurden. Die Vergrösserung der oberflächlichen Lymphknoten verlor sich im Laufe von 6 Wochen vollständig, und gleichzeitig war das Blutbild wieder normal geworden. Nach der Schlachtung fand sich keine Vergrösserung der Lymphknoten, ebenso wie auch Milz, Leber und Knochenmark unverändert waren. Das mikroskopische Bild dieser Organe war ebenfalls wie bei gesunden gleichalterigen Kälbern. Es ist also nicht gelungen, durch intravenöse Injektion von Serum lymphozytomatöser Tiere bei proteinvergifteten Kälbern den Symptomenkomplex der Lymphozytomatose hervorzurufen.

Versuch mit Injektion von Lymphknotenpresssaft lymphozytomatöser Kühe bei proteinvergifteten Kälbern.

Zu diesem Versuche wurden 2 Mastkälber angewandt, die nach 5 Wochen intravenöser Magermilchinjektionen subkutan mit Presssaft der Lymphknoten von R 1 geimpft wurden. Der Presssaft wurde möglichst bald nach der Entnahme der Lymphknoten hergestellt. Die Tiere wurden 4½ Monate lang beobachtet, bis sie auf Grund von Futtermangel geschlachtet werden mussten. Es wurde nur eine einzige subkutane Injektion von Lymphknotenpresssaft vorgenommen. Jedes Kalb erhielt insgesamt 15 ccm Presssaft. Nach der Injektion des Presssaftes wurde mit den Proteininjektionen aufgehört. Während der 4½ Monate dauernden Beobachtungszeit wurden die Tiere einmal wöchentlich klinisch und einmal monatlich hämatologisch untersucht.

Unmittelbar nach der Injektion des Presssaftes, die an der linken Halsseite vorgenommen wurde, beobachtete man eine kräftige Vergrösserung des regionären Buglymphknotens. Die Vergrösserung hielt sich 4 Wochen unverändert, wonach sie allmählich abnahm. Der Buglymphknoten der entgegengesetzten Seite sowie die Leistenlymphknoten zeigten von der 3. bis zur 5. Woche eine recht beträchtliche Vergrösserung. Diese

nahm dann in den folgenden Wochen gradweise ab, und bei der Schlachtung der Tiere waren sämtliche Lymphknoten von derselben Grösse wie bei gesunden Mastkälbern im selben Alter. Die vergrösserten Lymphknoten zeigten keine Wärmehöherhöhung oder Schmerzempfindlichkeit. Die hämatologischen Untersuchungen ergaben in den ersten beiden Wochen nach der Injektion des Pressaftes keine Abweichungen von den in gewöhnlicher Weise proteinvergifteten Kälbern, und nach diesem Zeitpunkte war die Blutzusammensetzung, abgesehen von einer gradweise abnehmenden Anämie, wie bei gesunden Kälbern.

Bei der Obduktion wurden keine pathologischen Veränderungen in Milz, Leber, Lymphknoten und Knochenmark gefunden. Die histologische Untersuchung dieser Organe ergab gleichfalls keine Veränderungen, die mit denen der Rinderlymphozytomatose identifiziert werden könnten.

Impfversuche an proteinvergifteten Kälbern mit Milzpressaft von lymphozytomatösen Kühen.

Es wurden zu dem Versuche zwei Mastkälber angewandt, die beide, nach 5 Wochen Vorbehandlung mit intravenösen Magermilchinjektionen, in die linke Halsseite 20 ccm Milzpressaft von R 1 eingepfist bekamen. Der Milzpressaft wurde möglichst bald nach der Schlachtung hergestellt, bis auf 5° C abgekühlt und im Verlaufe von weniger als einer Stunde an die Versuchskälber verimpfst. Die Reaktion und die Obduktion wichen nicht von den Verhältnissen bei den Kälbern ab, welche mit Pressaft der Lymphknoten geimpfst wurden. Die Beobachtungszeit war wie bei den Tieren der beiden vorausgehenden Gruppen auf 4½ Monate beschränkt, da die Futter-situation auch hier zu einer früheren Schlachtung der Tiere als berechnet führte.

Die Ergebnisse der obigen Untersuchungen sind:

1. *Ein eventuelles unbekanntes Virus (Dobberstein) als Ursache der Rinderlymphozytomatose vermag nicht den Symptomenkomplex der Krankheit bei Kälbern hervorzurufen,*

die man vermittels täglicher intravenöser Magermilchinjektionen durch mehrere Wochen hindurch besonders empfänglich für die Erkrankung zu machen versucht hatte.

2. Die Reaktion, die im Anschluss an die Injektion zellarmen Materials von lymphozytomatosekranken Kühen mit Vergrösserung der regionären Lymphknoten auftritt, ist eine unspezifische vorübergehende Reaktion, welche sich nicht mit den chronischen Veränderungen der Rinderlymphozytomatose im lymphatischen Apparat des Organismus identifizieren lässt.

Versuch mit Transplantation lymphozytomatösen Lymphknotengewebes auf nicht proteinbehandelte, gesunde Kälber.

Zu dem Versuch wurden 4 Mastkälber verwendet. Jedes Kalb wurde subkutan an der linken Halsseite mit 20 ccm Schabsel der von L 1 stammenden Lymphknoten geimpft. Das Schabsel wurde sofort nach der Tötung des Tieres hergestellt und im Verlaufe von weniger als 10 Min. an die Versuchskälber verimpft. Bei 2 der Kälber trat im Anschlusse an die Impfung Abszessbildung auf. Gleichzeitig reagierten die regionären Lymphknoten kräftig mit beträchtlicher Vergrösserung und Schmerzempfindlichkeit. Nach der akuten Reaktion und nach Spaltung der gebildeten Abszesse verschwand die lokale Reaktion schnell, während gleichzeitig die Vergrösserung der regionären Lymphknoten gradweise abnahm und im Laufe von 2 Monaten gänzlich verschwunden war. Ausser diesen Veränderungen wurden im Laufe einer 4monatlichen Beobachtungszeit keine klinischen Symptome bei den geimpften Kälbern nachgewiesen. Die Blutuntersuchungen zeigten in der Zeit der akuten Reaktion und der Abszessbildung eine leichte Leukozytose mit bis zu 13400 Leukozyten pr. cmm Blut, und zugleich war Polynukleose und Linksverschiebung des neutrophilen Kernbildes vorhanden. Bei der Obduktion fand sich nichts vor, was mit dem Obduktionsbilde der Rinderlymphozytomatose verglichen werden konnte. Das gleiche war der

Fall bei der histologischen Untersuchung. *Das Ergebnis des Transplantationsversuches war also bei diesen Kälbern negativ.*

Bei den zwei letzten Kälbern verlief die Transplantation ohne Sekundäraffektionen. Nach Verlauf von 7 Tagen war die Impfstelle, abgesehen von einer leichten Schwellung, welche keine Empfindlichkeit zeigte, zur Ruhe gekommen. Die lokalen Lymphknoten reagierten nur mit einer leichten Vergrößerung von wenigen Tagen Dauer. Danach war das klinische Bild 6 Wochen lang unverändert. Nach diesem Zeitpunkte trat bei beiden Kälbern eine gradweise zunehmende Vergrößerung der regionären Lymphknoten auf. Dieselbe dauerte bei dem einen Kalbe bis 4 Monate nach der Impfung, worauf sie wieder abnahm und verschwand, sodass bei der Schlachtung des Tieres 7 Monate nach dem Impfen eine Vergrößerung der Lymphknoten nicht mehr klinisch nachgewiesen werden konnte. Die Obduktion des Kalbes zeigte, dass sämtliche Lymphknoten leicht vergrößert waren. Ihre Schnittflächen waren sehr feucht, aber mit guterhaltener Struktur. Milz, Leber und Knochenmark zeigten keine makroskopischen Veränderungen. Die histologische Untersuchung von Lymphknoten, Milz, Leber und Knochenmark erwies, dass diese Organe nicht lymphozytomatös umgebildet waren. *Der Versuch war also negativ mit Hinblick auf Transplantation des spezifischen Gewebes der Lymphozytomatose.*

Bei dem 4. und letzten der Kälber, an denen die Transplantation der Lymphozytomatose versucht wurde, trat wie bei den vorausgehenden nach Verlauf von 6 Wochen eine allmählich zunehmende Vergrößerung der oberflächlichen Lymphknoten auf; diese vergrößerten sich ständig, wenn auch langsam, sodass sie nach 7 Monaten doppelt so gross waren als bei gleichalterigen Kälbern. Danach trat ein Stillstand ein, dem schliesslich eine langsame, allmähliche Verkleinerung der vergrößerten Lymphknoten folgte. Bei der Schlachtung des Tieres, 9 Monate nach Beginn des Transplantationsversuches, waren die oberflächlichen Lymphknoten ebenso wie die verschiedenen Organlymphknoten von der-

selben Grösse wie bei gleichalterigen Kälbern. Die Milz, die Leber und das Knochenmark zeigten bei makroskopischer Untersuchung ebenfalls keine Veränderungen von der Norm. Die histologische Untersuchung von Lymphknoten, Milz, Leber und Knochenmark ergab, dass sich in diesen Organen keine Veränderungen von einer der Rinderlymphozytomatose entsprechenden Art nachweisen liessen. *Dieser Versuch einer Transplantation des spezifischen Gewebes der Lymphozytomatose ist also auch negativ verlaufen.*

Als Ergebnis der Transplantationsversuche mit spezifischem Gewebe der Lymphozytomatose kann daher folgendes ausgesagt werden:

1. *Es ist nicht gelungen, durch massive subkutane Injektionen lebenden Gewebes von Lymphknoten lymphozytomatöser Kühe das charakteristische, klinische, anatomische oder histologische Bild bei den Versuchstieren hervorzurufen.*

2. *Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse geben keine Aufschlüsse darüber, inwieweit die bei den Versuchstieren auftretende Vergrösserung der oberflächlichen Lymphknoten irgendeine Verbindung mit dem von Dobberstein als Ursache der Rinderlymphozytomatose angenommenen Virus hat.*

Die vorliegenden Untersuchungen über experimentelle Erzeugung der Rinderlymphozytomatose lassen es wenig wahrscheinlich erscheinen, dass dieselbe von einem spezifischen Virus verursacht wird; denn selbst nachdem die Widerstandskraft der Tiere durch eine chronische Vergiftung mit parenteral zugeführtem Albumin geschwächt worden war, gelang es nicht, bei den Versuchstieren die Erkrankung mit Hilfe eines zellarmen Materiales (Blutserum, Presssaft veränderter Organe) hervorzurufen. Die Möglichkeit, dass ein eventuelles Virus an die Zellen gebunden ist und deshalb nicht in ausreichender Menge in den verschiedenen Gewebssäften vorkommt, um die Krankheit hervorrufen zu können, kann vermutlich ebenfalls auf Grund der vorgenommenen Untersuchungen ausgeschlossen werden; denn, selbst nach massiven Injektionen zellenreichen Materiales (Schabsel von Lymphknoten) aus Organen mit lymphozytomatösen Veränderungen,

gelang es nicht, die charakteristischen Lymphozytomatoseveränderungen zu erzeugen.

Als andere mögliche ätiologische Faktoren sind Bodenverhältnisse, Trinkwasser und Erbllichkeit genannt worden (*du Toit, Aronsohn, Lockau, Collier u. a.*).

. Meine Untersuchungen scheinen jedoch besondere Bodenverhältnisse und Trinkwasser als ätiologisches Moment auszuschliessen; denn von den untersuchten Tieren stammt E 1 aus Nordwestseeland, E 2 und E 3 aus Südwestseeland, O 1, O 2, R 1 und R 2 aus Südseeland, T 1 aus Jütland, S 1 aus Ostseeland und L 1 aus Nordseeland, mit anderen Worten aus weit verschiedenen Teilen des Landes von Lokalitäten mit ganz verschiedenen Bodenverhältnissen. Das zeigt, dass die in Dänemark auftretende Lymphozytomatose des Rindes willkürlich und ohne gesetzmässigen Zusammenhang mit spezifischen Bodenverhältnissen vorkommt. Dieses Verhalten ist in voller Übereinstimmung mit dem Auftreten der Krankheit in Deutschland, wo es ebenfalls nicht möglich gewesen ist, irgend ein gesetzmässiges Verhältnis zwischen dem Vorkommen der Rinderlymphozytomatose und den speziellen Bodenverhältnissen nachzuweisen (*Feurherm, Lockau, Dobberstein und Paarmann*).

Es lässt sich indessen nicht bestreiten, dass die Krankheit in einigen Fällen ein anscheinend ortsgebundenes Moment hat. So habe ich das Leiden als anscheinend stationär in Rittergutsbeständen auf Lyngbygaard in Südwestseeland und auf den Höfen des Gutes Rosenfeldt in Südseeland nachweisen können. An diesen beiden Stellen ist die Krankheit eine Reihe von Jahren hindurch stationär gewesen und hat jährlich mehrere Erkrankungsfälle in den Beständen verursacht. Es ist daher natürlich, wenn man an solchen Orten die Erkrankung in Verbindung mit Vererbung bringt. Auf Lyngbygaard bekommt das Erbllichkeitsmoment eine erhöhte Bedeutung als ätiologischer Faktor, weil hier nach mündlichen Mitteilungen von Tierarzt *Dalsgaard*, Skelskor, zwei Stiere von Lymphozytomatose angegriffen gewesen waren, von wel-

chen der grösste Teil des Rindviehbestandes des Gutes abstammt, sodass es begreiflich ist, dass man hier die Krankheit als erblich bedingt auffasst. In den Jahren 1940/41 sind, soweit ich erfahren konnte, nur 3 sichere Fälle von Lymphozytomatose unter den ca. 200 Rindern des Gutes aufgetreten. Das deutet daraufhin, da die Rinder von den zwei genannten, von Lymphozytomatose befallenen Stieren abstammen, dass ein eventueller, erblich bedingter Faktor rezessiver Art sein muss und nur eine bescheidene Rolle in diesem Bestande spielt. Auf dem Hofe Oregaard des Gutes Rosenfeldt sind in den Jahren 1940 und 1941 5 Lymphozytomatosefälle unter den ca. 200 Milchkühen des Bestandes vorgekommen. Bei einer Durchsicht der Stammtafeln der Tiere liess sich keine Verwandtschaft zwischen drei der betreffenden Tiere untereinander oder zwischen diesen und den beiden anderen angegriffenen Tieren nachweisen. Die beiden zuletzt befallenen Tiere waren Halbgeschwister, von denen das eine ausserdem die Tochtertochter ihres Vaters war. Es besteht also auch hier die Möglichkeit, dass ein rezessiver Faktor sich bei dem Auftreten der Krankheit im Bestande geltend macht. Das Material ist jedoch zu klein und zu einseitig, als dass man entscheidende Schlüsse aus demselben mit Bezug auf die Frage der eventuellen Vererblichkeit der Krankheit ziehen kann.

Die ätiologischen Untersuchungen zeigen:

1. *Die Lymphozytomatose des Rindes wird von keinem spezifischen Virus verursacht.*

2. *Die Lymphozytomatose des Rindes rührt nicht von besonderen Bodenverhältnissen auf den Gütern her, auf welchen die Krankheit stationär auftritt.*

3. *Die Möglichkeit, dass die Erkrankung erblich bedingt ist, lässt sich nicht auf Grund des vorliegenden Untersuchungsmaterials abweisen. Die Verhältnisse in ein paar Rittergutsbeständen deuten die Möglichkeit an, dass rezessive Erbfaktoren eine Rolle für die Entstehung der Krankheit spielen.*

Möglichkeiten für vorbeugende Massnahmen zur Bekämpfung der von der Krankheit verursachten Verluste.

Das Leiden hat in den Ländern und Gegenden, wo es stationär auftritt, erhebliche Verluste zur Folge, weil seine Entwicklung mit nur wenig ins Auge fallenden, klinischen Symptomen in Verbindung damit, dass das Fleisch der angegriffenen Tiere zur menschlichen Ernährung ungeeignet ist, mit sich bringt, dass die Tiere erst in einem so späten Stadium der Krankheitsentwicklung geschlachtet werden, dass die Körper als ungeeignet zur menschlichen Nahrung kassiert werden müssen. In Deutschland geht die Grösse der Verluste direkt aus den zitierten Angaben über die Häufigkeit der Erkrankung unter deutschen Rindern hervor. Man (*du Toit, Menck*) hat daher durch systematische Blutuntersuchungen bei den Tieren bedrohter Bestände — eventuell nur bei Tieren, die im Verdacht standen, von Lymphozytomatose angegriffen zu sein (*Knuth & Volkmann*) — den Versuch gemacht, befallene Tiere in einem so frühen Stadium der Krankheit herauszufinden, dass dieselbe noch nicht auf die Anwendbarkeit des Fleisches zur menschlichen Nahrung eingewirkt hat.

Von den Forschern, die sich mit der Hämatologie der Erkrankung und den Abschnitten derselben, die in diesem Zusammenhange von Interesse sind, beschäftigt haben, seien angeführt: *Knuth & Volkmann* nahmen Blutuntersuchungen bei 29 Kühen vor, welche im Verdacht standen, von Lymphozytomatose angegriffen zu sein. Das Blutbild war bei diesen Tieren analog demjenigen einer an Lymphozytomatose leidenden Kuh. *Knuth* und *du Toit* behaupten, dass die Lymphozytomatose durch eine Vermehrung der absoluten Leukozytenzahl, verbunden mit einer Erhöhung der relativen Lymphozytenzahl, sowie durch Änderungen in der Morphologie der letzteren gekennzeichnet wird. Die beiden letztgenannten Faktoren haben den grössten diagnostischen Wert. *Du Toit* und *Lengwenath* betonen, dass die Lymphozytomatose durch eine Erhöhung der Leukozytenzahl zugleich mit einer Vermehrung der relativen Lymphozytenzahl und Juvenilität der letzteren gekennzeichnet wird. *Du Toit* gibt jedoch gleichzeitig an, dass selbst bei Tieren, die lange Zeit hindurch ausgeprägte lymphozytomatöse Blutbilder in progressiver Entwicklung

zeigten, weswegen diese Tiere als von chronischer Lymphozytomatose befallen anzusehen sind, sich keine klinischen Symptome der Krankheit nachweisen liessen. *Menck* glaubt, dass Rinder, die mehr als 80 % Lymphozyten im peripheren Blute haben, von Lymphozytomatose angegriffen sind. Doch konnte er bei 4 derartigen Tieren keine anderen Anhaltspunkte für die Diagnose nachweisen. *Jarmai* ist daher der Ansicht, dass man bei der Diagnostizierung der Krankheit allein auf der Grundlage von Blutuntersuchungen Vorsicht anwenden müsse. Er ist hierbei in Übereinstimmung mit *Knuth*, der 1928 davor warnt, Tiere wegen Lymphozytomatose notzuschlachten, falls ausgebreitete Lymphknotenvergrösserungen bei denselben fehlen. *G. Piening* meint, dass nur die Morphologie der Leukozyten eine Bedeutung für die Diagnostizierung der Leukose beim Rinde hat.

Eigene Untersuchungen.

Durch Herrn Tierarzt *Jorgensen's* und Kreistierarzt *Niel-sen's* Interesse für die Sache kam ich in Verbindung mit dem Zuchtviehhof *Oregaard* des Gutes *Rosenfeldt*, wo die Lymphozytomatose stationär auftrat. Dank dem Verständnis für die Wichtigkeit der Sache für die Viehzucht, das die Herren *Gutsinspektor*, *Pächter Ronholdt* und *Verwalter Nielsen* zeigten, und dank ihrem liebenswürdigen Entgegenkommen war es mir möglich, systematische Blutuntersuchungen an dem Rindviehbestande von *Oregaard* vorzunehmen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3 wiedergegeben. In derselben sind nur die Untersuchungsergebnisse für die Verhältnisse der Lymphozyten und der pathologischen mononukleären Blutzellen aufgeführt. Diese Vereinfachung bringt mit sich, dass die Untersuchungsergebnisse besonders übersichtlich werden; und dieselben sind ausreichend zur Entscheidung der vorliegenden Fragen.

Die Untersuchungen zeigten, dass die absolute Leukozytenzahl ohne Bedeutung für die Entscheidung darüber war, ob eine Kuh von Lymphozytomatose angegriffen ist oder nicht, was auch durch die hämatologische Untersuchung von Kühen, die von Lymphozytomatose befallen sind (Tabelle 1), bewiesen wird. Die Mehrzahl der Tiere zeigte eine Leukozyten-

zahl, welche innerhalb der physiologischen Variationsbreite derselben bei Rindern lag; doch gab es bei einigen der untersuchten Tiere eine erhebliche Vermehrung der absoluten Zahl der Leukozyten — ganz hinauf bis zu subleukämischen Werten —, ohne dass die Tiere von Lymphozytomatose angegriffen waren. Es liegt ausserhalb des Rahmens dieser Arbeit, die Ursache dieser hohen Leukozytenwerte zu untersuchen. Ein Hinweis darauf muss genügen, dass Leukozytosen im Anschluss an oder als Nachwirkung von mehreren verschiedenen Ursachenmomenten auftreten können (Infektion, Intoxikation u. a.).

Tabelle 3.

Mehr als 90 % Lymphozyten	2 Tiere
Von 80 bis 89 % Lymphozyten	29 Tiere
Von 70 bis 79 % Lymphozyten	65 Tiere
Von 60 bis 69 % Lymphozyten	89 Tiere
Weniger als 60 % Lymphozyten	183 Tiere
Insgesamt untersucht	368 Tiere

Keine pathologischen mononukleären Zellen im Blut ..	139 Tiere
Weniger als 5 % patholog. mononukleäre Zellen im Blut	139 Tiere
Von 5 bis 9 % patholog. mononukleäre Zellen im Blut ..	52 Tiere
Von 10 bis 14 % patholog. mononukleäre Zellen im Blut	27 Tiere
Von 15 bis 19 % patholog. mononukleäre Zellen im Blut	9 Tiere
Mehr als 20 % patholog. mononukleäre Zellen im Blut ..	2 Tiere
Insgesamt untersucht	368 Tiere

Unter Lymphozyten werden solche Blutzellen verstanden, die völlig identisch mit den Lymphozyten des gesunden Blutes und deren Riederzellen sind; mit pathologischen mononukleären Zellen sind Blutzellen gemeint, die morphologisch nicht mit den Lymphozyten, Riederzellen und Monozyten des gesunden Blutes identifiziert werden können. Diese Zellen sind in morphologischer Hinsicht ganz gleich den pathologischen Blutzellen im Blute von Rindern, die von Lymphozytomatose angegriffen sind, und sie unterscheiden sich von diesen nur durch geringfügige Verschiedenheiten in der Chromatinstruktur sowie durch das Fehlen von Nukleolen (s. im übrigen den Text).

Tabelle 3 zeigt, dass die relative Verteilung der Leukozyten eine unzureichende Grundlage für die Diagnostizierung

der Lymphozytomatose bildet. Wie aus der Tabelle hervorgeht, würden 31 Tiere des Bestandes als angegriffen von der Krankheit bezeichnet werden müssen, falls man *Menck's* Auffassung folgte, dass Kühe mit mehr als 80 % Lymphozyten in dem peripheren Blut von Lymphozytomatose befallen sind — die klinische Untersuchung ergab, dass *nur 5 Tiere in dem Zeitraum, über den sich die Untersuchungen erstreckten, an Lymphozytomatose litten, und keines von diesen hatte relative Lymphozytenwerte von über 80 %*. Falls man *Menck's* Auffassung der Bekämpfung des Leidens in dem Bestande zugrunde gelegt hätte, wären 31 sehr leistungsfähige, wertvolle Tiere ohne jeglichen Nutzen geschlachtet worden, während trotz einer solchen Massnahme der Verlust infolge der Erkrankung gleich gross gewesen wäre. Die Untersuchungen zeigten ausserdem noch, dass bei einem Teile der Tiere mit Lymphozytose bei Wiederholung der Untersuchungen keine Erhöhung der relativen Lymphozytenzahl vorhanden war. Dazu kommt, dass *keines der Tiere, trotzdem die Untersuchungen sich über einen Zeitraum von mehr als 2 Jahre erstreckten, klinische Anzeichen von Lymphozytomatose zeigte*. Es kann deshalb nicht kräftig genug davor gewarnt werden, die Diagnose Lymphozytomatose allein auf Grund einer einseitigen Erhöhung der Lymphozytenzahl im peripheren Blut zu stellen.

Die Tabelle zeigt fernerhin, dass die relative Anzahl der pathologischen mononukleären Zellen im peripheren Blut ebenfalls ohne entscheidende Bedeutung für die Diagnose, Lymphozytomatose oder nicht, beim Rinde ist. Es geht aus den Untersuchungen hervor, dass die Anzahl dieser Zellen nicht nur beträchtlich von dem einen Tier zum anderen variiert; *sie ist ausserdem noch grossen Schwankungen bei dem einzelnen Tiere in den verschiedenen Untersuchungs-terminen unterworfen*. Das beweist, dass *Jarmai's* und *Knut's* Warnung davor, die Krankheit ausschliesslich auf der Grundlage hämatologischer Untersuchungen zu diagnostizieren, berechtigt ist. Die hämatologische Untersuchung ist indessen nicht mit der Feststellung der absoluten Leukozytenzahl und

der relativen Anzahl der verschiedenen Leukozytenarten abgeschlossen. Diese Faktoren sind zwar von Bedeutung für die hämatologische Diagnose, aber der entscheidende Faktor ist doch die Beschaffenheit der auftretenden Leukozyten. Mit Bezug hierauf geben diese Untersuchungen nur Aufschlüsse über die Morphologie und, soweit es auf einer solchen Grundlage möglich ist, darüber, ob es sich um reife oder unreife Zellen handelt. Es zeigte sich dabei, dass unreife mononukleäre Zellen in ziemlich ansehnlicher Menge in dem peripheren Blute eines Teiles der Tiere vorkamen, während es bei anderen nur reife mononukleäre Zellen gab. Dadurch scheint also *Piening's* Angabe bestätigt zu werden, dass die Qualität der Leukozyten und nicht ihre Quantität entscheidend für die Frage nach der Diagnose Lymphozytomatose ist. Doch bei einem Vergleiche der hämatologischen Untersuchungsergebnisse mit den klinischen Verhältnissen in dem Bestande erwies es sich, dass die Untersuchungen der Qualität der Leukozyten ebensowenig wie die quantitativen Untersuchungen derselben eine ausreichende Grundlage für die Diagnostizierung der Lymphozytomatose abgeben. Das steht in voller Übereinstimmung mit den Resultaten der histologischen Untersuchungen, welche zeigten, dass die Krankheit wahrscheinlich in die Gruppe der malignen Blastome gehört, und dass die pathologischen, im peripheren Blute vorkommenden Zellen als blutfremde Blastomzellen aufzufassen sind. Aber wenn das der Fall ist, kann man nicht erwarten, dass die pathologischen Zellen in einigermaßen ansehnlicher Menge im peripheren Blut auftreten, ehe nicht die Krankheit einen gewissen Entwicklungsgrad erreicht hat; d. h. *ein positives Resultat einer hämatologischen Untersuchung lässt sich erst zu einem Zeitpunkte erwarten, an dem die Krankheit mittels einer üblichen klinischen Untersuchung diagnostiziert werden kann.* Das bringt mit sich, dass man mit Hinblick auf die Bekämpfung der Erkrankung oder mit Hinblick auf die Verhinderung von Verlusten infolge derselben kein Resultat auf der Grundlage einer systematischen Blutuntersuchung in Viehbeständen erwarten kann, in welchen das Leiden stationär auftritt.

LITERATURVERZEICHNIS.

- Ade*: Dtsch. Fleischbeschauzt. Bd. 9, p. 88, 1912.
Ahlstrom: Acta med. Scand. Bd. 10, p. 241, 1933.
Alder: Hæmatologica Bd. 4, p. 421, 1923.
Andref zit. nach Ellenberger u. Schütz: Jbr. 1930, p. 579.
Apitz, K.: Virch. Arch. Bd. 289, p. 46, 1933.
 — Ibid. Bd. 299, p. 1, 1937.
 — Erg. d. allg. Pathol. Bd. 35, p. 1, 1940, Literatur.
Aronsohn: Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 33, p. 205, 1917.
Aschoff: Erg. inn. Med. Bd. 26, p. 1, 1924.
Aschoff und Kiyono: Fol. haem. Bd. 15, p. 383, 1913.
Baumgärtner, H.: Zt. Fl. u. Milchhyg. Bd. 46, p. 169, 1936.
Beijers und de Graaf: Tijdsch. Diergeneeskd. Bd. 50, p. 703, 1923.
Benecke: Virch. Arch. Bd. 286, p. 693, 1932.
Bloom: Arch. exp. Zellforsch. Bd. 5, p. 269, 1928.
 — Fol. haem. Bd. 37, p. 1 und 63, 1928.
Hülöw: Inaug. Diss. Hannover 1932.
Büngeler: Frankf. Ztschr. Pathol. Bd. 44, p. 202, 1933.
 — Beitr. pathol. Anat. Bd. 76, p. 181, 1927.
 — Fol. haem. Bd. 37, p. 204, 1928.
Collier, K.: Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 50, p. 531, 1934.
Cowdry, E. W.: Special Cytology 1928.
Dimock und Thomsen: Amer. Veter. Rev. Bd. 30, p. 553, 1906.
Dobberstein: Dtsch. tierärztl. Wochenschr. Bd. 42, p. 289, 1934.
 — Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 50, p. 192, 1934.
Dobberstein und Paarmann: Zt. Inf. Krankh. Haustiere Bd. 46, p. 65, 1934.
Dobberstein und Piening: Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 50, p. 449, 1934.
Engelbreth-Holm und N. Plum: Skand. Vet. Tidsskr. 51, 1941, 705.
Egehoj, J.: Mndskr. Dyr. Bd. 44.
 — Skand. Veter. Tidsskr. 1940, p. 141 und 401.
Ehrich, W.: Erg. allg. Pathol. Bd. 29, p. 1, 1934, Literatur.
Eilmann: Dtsch. tierärztl. Wochenschr. Bd. 37, p. 51, 1929.
Espacito: Hæmatologica Bd. 4, p. 269, 1923.
Esser und Schütz: Arch. Tierheilkd. Bd. 16, p. 113, 1896.
Ewers: Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 49, p. 597, 1933.
Feldmann, Jr.: Amer. Veter. Med. Assoc. Bd. 73, p. 206, 1928.
Feurherm: Inaug. Diss. Berlin 1937.
Franke, R.: Zt. Fl. u. M. hyg. Bd. 42, p. 70, 1932.
Franke und Ferrata: Arch. Sci. Med. Bd. 61, p. 109, 1919.
 — — Hæmatologica Bd. 3, p. 524, 1922.
Furth, Jr.: Exp. Med. Bd. 61, p. 423, 1934.
 — Arch. Pathol. Bd. 20, p. 379, 1935.

- Furth, Seibold u. Rathbone:* Cancer Bd. 19, p. 521, 1933.
- Goodall:* Jr. Bact. a. Pathol. Bd. 14, p. 195, 1909.
- Grégoire, Ch.:* Krankheitsforsch. Bd. 9, p. 97, 1932.
- Hall:* Fol. haem. Bd. 43, p. 206, 1931.
- Harrewelt:* Hol. tierärztl. Zt. Bd. 27.
- Heidrick:* Dtsch. tierärztl. Wochenschr. Bd. 44, p. 227, 1936.
- Henschen in Joest:* Handb. Pathol. Anat. Haustiere Bd. 5, p. 305, 1929.
- Hittmair, A.:* Fol. haem. Bd. 37, p. 321, 1928.
- Ibid. Bd. 39, p. 348, 1930.
- Hittmair in Hirschfeld und Hittmair:* Handb. d. allg. Hämatologie I. Teil, 1. Bd.
- Hjärre und Berthelsen:* Acta Pathol. Scand. Suppl. Bd. 26, 1932, Literatur.
- Holler:* Fol. haem. Bd. 29, p. 84, 1923.
- Hörshold, K.:* Virch. Arch. Bd. 299, p. 686, 1937.
- Jarmai, K.:* Erg. allg. Pathol. Bd. 28, p. 227, 1924, Literatur.
- Jeckeln, E.:* Beitr. pathol. Anat. Bd. 94, p. 51, 1934.
- Jones, J. Howard:* Veter. Rec. Bd. 18, p. 135, 1928.
- de Jong:* Virch. Arch. Bd. 173, p. 511, 1903.
- Junack:* Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 48, p. 277, 1932.
- Juraschke:* Inaug. Diss. Leipzig. 1922.
- Jorgensen, Kaalund:* Zt. Krebsforsch. Bd. 42, p. 393, 1935.
- Acta radiologica. Scand. Suppl. Bd. 29.
- Kiyono:* Die vitale Karminspeicherung. Jena. 1914.
- Knepper, R.:* Virch. Arch. Bd. 296, p. 364, 1936.
- Knoll:* Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 6, p. 243, 1890.
- Knuth in Kolle-Wassermann:* Handb. d. pathol. Mikroorganismen Bd. 9, p. 457, 1928.
- Arch. Tierheilkd. Bd. 43, p. 129, 1917.
- Knuth und du Toit:* Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 33, p. 205, 1917.
- Knuth und Volkmann:* Ztschr. Inf. Krankh. Haustiere Bd. 17, p. 393, 1916.
- Krebs, Rask-Nielsen und Wagner:* Acta radiolog. Scand. Suppl. 1930.
- Kuckzynski:* Virch. Arch. Bd. 239.
- Lejeune:* Fol. haem. Bd. 19, p. 371, 1915.
- Lengwenath:* Inaug. Diss. Hannover. 1931.
- Lockau:* Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 49, p. 177, 1933.
- Totzek, Zumpe u. Lommatsch:* Zt. Fl. u. M. hyg. Bd. 51, p. 64, 1940.
- Lukes:* Prag. Arch. Tierheilkd. Bd. 6, p. 35, 1926.
- Lund, L.:* Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 35, p. 51, 1927.
- Dtsch. tierärztl. Wochenschr. Bd. 44, p. 175, 1936.
- Lübke:* Arch. wiss. u. prakt. Tierheilkd. Bd. 74, p. 325, 1938.
- Marek in Hutyra u. Marek:* Handb. Spez. Pathol. Haustiere 1922.

- Masugi*: Beitr. pathol. Anat. Bd. 76, p. 396, 1927.
Maximow: Arch. exp. Zellforsch. Bd. 4, p. 1, 1927.
 — Ibid. Bd. 5, p. 169, 1928.
Menck: Inaug. Diss. Giessen 1928.
Naegeli, O.: Blutkrankh. u. Blutdiagnostik. 1931. Literatur.
Nieberle: Festschr. f. H. Baum. 1929.
Nieberle u. Cohrs: Lehrb. Spez. Pathol. Anat. Haustiere. 1931.
Nyfeldt, Aa.: Fol. haem. Bd. 47, p. 1, 1932.
 — Ugeskr. Læger. p. 82, 1932.
Oberling: Bull. Assoc. franc. Etud. Canc. Bd. 18 und 19.
de Oliveira: Virch. Arch. Bd. 298, p. 464, 1937.
Olesen, M.: Med. Disp. Kbh. 1937, Literatur.
Parks, A. E.: Beitr. pathol. Anat. Bd. 94, p. 245, 1934.
Pentimalli: Virch. Arch. Bd. 193, p. 275, 1930.
Piening, C.: Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 50, p. 580, 1934.
Reisinger: Wien. tierärztl. Monatschr. Bd. 20, p. 194, 1920.
Reitano: Hämatologica Bd. 3, p. 524, 1922.
Roulet: Virch. Arch. Bd. 277, p. 15, 1930.
 — Ibid. Bd. 286, p. 702, 1932.
Rössle: Ibid. Bd. 275, p. 1 und 310, 1930.
Sabin, Doan u. Cunningham: Contrib. Embryol. 84, Carneg. Instit. Wash. 16, 224.
Schilling: Zt. klin. Med. Bd. 88, p. 377, 1919.
 — Blutbild 1933.
Schittenhelm und Erhardt: Zt. exp. Med. Bd. 24, p. 225, 1925.
Schwirtschewskaja: Virch. Arch. Bd. 267, p. 456, 1928.
Schultz: Inaug. Diss. Bern. 1904.
Siegmund: Münchn. med. Wochenschr. Bd. 70, p. 5, 1923.
Snijders: Nederl. Tijdschr. Diergeneesk. Bd. 10, p. 125, 1926.
Sternberg: Erg. allg. Pathol. Bd. 30, p. 1, 1936.
Sternberg in Henke-Lubarsch: Handb. allg. Pathol. u. Hist. 1927.
Storch: Inaug. Diss. Berlin 1901.
du Toit: Arch. Tierheilkd. Bd. 43, p. 145, 1917.
 — Ztschr. Inf. Krankh. Haustiere Bd. 20, p. 320, 1920.
Töllner: Inaug. Diss. Hannover 1931.
Udall und Olafson: Cornell. Veter. Bd. 20, p. 81, 1930.
Utendörfer: Arch. Tierheilkd. Bd. 33, p. 329, 1907.
Vaubel: Beitr. pathol. Anat. Bd. 89, p. 374, 1932.
Volkmann: Tierärztl. Rdsch. Bd. 21, p. 389, 1929.
Wirth: Grundlagen einer klin. Hämatol. Haustiere 1931.
 — Mschr. Tierheilkd. Bd. 31, p. 97, 1920.
Wiessmann, E.: Schweiz. Arch. Tierheilkd. Bd. 72, p. 231, 1930.
Wittstock: Inaug. Diss. Berlin. 1922.
Wolf: Berl. tierärztl. Wochenschr. Bd. 8, p. 121, 1892.

STUDIES IN PNEUMOCOCCAL IMMUNITY. I.
FURTHER EXPERIENCES OF THE FREQUENCY OF THE
DIFFERENT TYPES OF PNEUMOCOCCUS IN
SOUTH SWEDEN.

By *Ove Möller*.

(Received for publication April 1st 1942).

When effective therapeutic antipneumococcic sera had been produced for the first time about twenty years ago, their use was somewhat restricted. At this time the only known types were I, II and III, and all the remaining strains were put into the heterogenous group IV, also called group X. Sera had successfully been produced from horses against types I and II, but not against type III.

It was not until the classification of pneumococci had been further developed by *Cooper* and her collaborators, until quicker and less difficult methods of type determination had been worked out and until the easier produced therapeutic rabbit sera had come into use about 1936, that the serum treatment of pneumonia gained ground. Indispensable for this therapy were however rapid and exact type-determination methods and such had also been found — the Sabin microscopic agglutination test and the »Neufeld reaction« (capsular swelling). Extensive type determinations were undertaken and ample reports on the frequency of the various types were published in different countries. The treatment

of pneumonia had become much more promising than earlier, but at the same time more complicated and laborious.

The situation was considerably simplified when the sulfanilamide compounds were discovered. These drugs, especially sulfapyridine and sulfathiazole, had a general effect on pneumonia irrespective of the etiological type of pneumococcus, and thus the interest in type determination quite naturally diminished.

It is evident, however, that typing of pneumococci still is of the greatest importance. Because of practical reasons, the cheaper and easier manageable chemotherapy has everywhere been adopted as the routine method in the treatment of pneumonia. But, in order to compare the results of this therapy with those of the serum treatment, it is necessary to know the type of the pneumococcal infection, as the gravity of the disease may change with the type. *Bullowa* finds for instance with the old symptomatic treatment a mortality of 42 % in type II against only 25 % in type I — thus an obvious distinction.

In quite a number of cases it has further been found that the chemotherapy does not have the desired effect or that the patient reacts with toxic manifestations, thus rendering the use of serum treatment necessary. In very grave cases, e. g. in type 3 pneumonia or in old patients with reduced resistance, a combined treatment with both sulfapyridine and serum may be advisable. *Long* and *Haviland* are of the opinion that 10—15 % of all cases of pneumonia are so grave that they demand an additional serum treatment.

A further reason for continued typing of pneumococci is to be found in the lately increased interest in the epidemiology of pneumonia. *Vammen* has published a series of familial cross infection and also of limited epidemics of pneumonia of a definite type, which clearly indicates a certain degree of contagiousness in this disease. A familial pneumococcal infection is included in the present material, too, consisting

of 4 cases of the relatively unusual type 15 and described in a special report by *Alwall*.

Quite recently special methods have been devised for testing the resistance against chemotherapeutics in various strains of pneumococci.¹⁾ By this means it is possible already at the beginning of the disease to estimate the chance of combating the infection through chemotherapy. If the tests point to a raised chemo-resistance, the serum therapy could be started immediately, if the type had been determined at the onset of the disease.

The effect of antipneumococcic serum is at its highest when given before the fourth day of the illness, as has been fully proved by American and Danish investigators. As has been mentioned above the chemotherapy must nevertheless be the routine method because of the expensiveness and limited supply of serum. In such cases where chemotherapy fails it is, however, of the greatest importance that serum be used as soon as possible. Consequently sputum samples ought to be sent in for type determination as early as possible in every case of pneumonia. It has moreover been found considerably more difficult to determine rapidly the type of pneumococcus in samples from patients already treated with chemotherapeutics.

What has been said above ought sufficiently to motivate a continued routine type determination of the bacterial flora in all cases of pneumonia. But still another point of view should be mentioned. It is evidently very difficult to keep stores of sera against every type of pneumococcus at all hospitals. It is therefore useful to know which types are predominant within a certain district and against which types sera ought in the first place to be prepared. It is further of both theoretical and practical interest to follow the annual variations in the frequency of various types during different periods. A knowledge of such fluctuations, which have been

¹⁾ *Sjöstedt, Vahlne and Berg*, Determination of the Resistance of Pneumococci to Sulphapyridine, *Acta path. scand.* 1942.

described by e. g. *Bullowa*, is of great importance in choosing the store of sera in a certain district.

Type determination of pneumococci was begun at the Bacteriological Institute of Lund in October 1937. The results of these determinations until the end of May 1939 have been published by *Asklund*, *Sjöstedt* and *Vahlne*, in whose work further details will be found. Their diagram of type distribution within pneumococcic pneumonia in Skåne is given below.

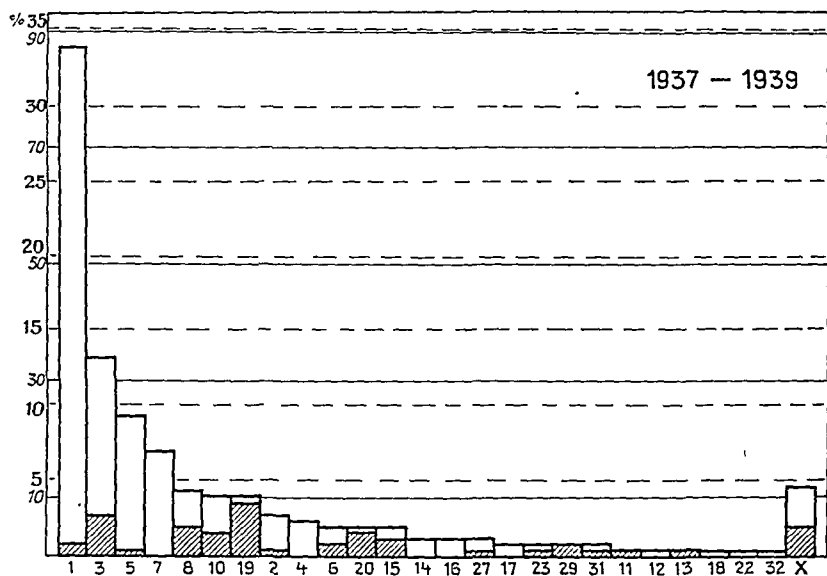


Fig. 1.

257 pneumococcal pneumonias Oct. 1937—May 1939.

The light areas of the diagram represent lobar pneumonia, the streaked parts bronchopneumonia. The X-marked group includes cases where more than one type has been found in the sample, or where the types are overlapping.

The frequency of types during this period, as given by these authors, corresponds well with that of foreign reports. It is interesting to notice, however, that in this material, as well as in a Danish one published by *Vammen* in 1938, type 2 shows a markedly lower frequency than in the American reports. *Vammen* also points out (1940) that variations in the type frequency during different periods of time and in

different places certainly occur. It has therefore seemed judicious to investigate whether any fluctuations in the type frequency could be found in the material of this institute since the abovementioned report was published.

Since that investigation was made the two types 33 and 34, identified by Danish investigators, have been added to the supply of diagnostic sera. These types were found in 6 cases in our material. The method employed is mainly the same as before and closely described by *Vammen* in 1940. If capsular swelling was found in one of the first serum mixtures, the determination was not continued through the whole series of serum mixtures on account of the relatively small number of cases with more than one type in the sample. Overlapping reactions have been noticed in 3 cases — two between types 11 and 16 and one between types 20 and 31.

During the time 30/5 1939—30/5 1941 545 sputum samples and 76 other samples have been received at the Bacteriological Institute for type determination. Pneumococci were found in 305 sputa and 69 other samples. Samples sent in from hospitals outside Skåne have been excluded here as in the earlier report. The reduced material is thus 341 samples with positive pneumococcic findings.

The clinical diagnosis has been collected in the 282 cases with pneumococcic findings in the sputum. They have then been brought together under the following headings: lobar pneumonia, bronchopneumonia, and other respiratory infections. There is in addition a fourth, rather mixed group, containing such cases where no pneumonia or any other respiratory infection has been found, but where the subsequent clinical course has revealed quite a different disease. The type distribution within these four groups is given in table 1. Here all types are represented except 27 and 28. These types have, however, been found each one time, in cerebrospinal fluid and in conjunctival secretion. Thus the material includes all the Cooper types and the two new Danish ones, 33 and 34.

Table 1.

282 pneumococc-positive sputa 30/5 1939—30/5 1941.

Type	Lobar Pneu- monia	Broncho- pneu- monia	All Cases of Pneu- monia	Other re- spiratory Infec- tions	Miscel- laneous	Total Cases
1.	37	2	39	1	—	40
2.	9	2	11	1	—	12
3.	31	11	42	—	3	45
4.	14	2	16	—	2	18
5.	6	1	7	—	—	7
6.	3	3	6	3	1	10
7.	11	2	13	—	3	16
8.	5	4	9	1	—	10
9.	2	1	3	2	—	5
10.	—	3	3	—	—	3
11.	3	2	5	1	1	7
12.	1	2	3	—	—	3
13.	1	2	3	1	1	5
14.	—	1	1	—	—	1
15.	3	4	7	3	1	10
16.	2	2	4	1	1	6
17.	1	3	4	3	—	7
18.	4	3	7	—	1	8
19.	5	7	12	—	1	13
20.	2	5	7	2	1	10
21.	1	1	2	—	—	2
22.	—	2	2	—	—	2
23.	2	3	5	1	—	6
24.	—	1	1	—	—	1
25.	3	1	4	1	—	5
29.	2	2	4	1	—	5
31.	1	1	2	—	—	2
32.	—	2	2	—	—	2
33.	1	1	2	—	—	2
34.	—	2	2	1	—	3
X.	8	4	12	3	1	16
	158	82	240	26	16	282

Types 26 and 30 are omitted, as they are generally considered to be identical with types 6 and 15 resp. The group marked X contains cases where more than one type has been observed in the sample or where the types are overlapping.

It may be rather difficult to differentiate between cases of lobar and broncho-pneumonia. The borderlines between these two forms are clinically rather vague, and in some cases of the present material sufficient data for making a distinction have not been available. Though of interest when studying the etiology of lobar and broncho-pneumonia, the classification has no bearing on the indications for specific therapy. Accordingly no great attention has been paid to these facts. It has therefore not been found necessary to introduce an intermediary group of pneumonia, as was done by *Gard, Löfström* and *Jacobsohn*.

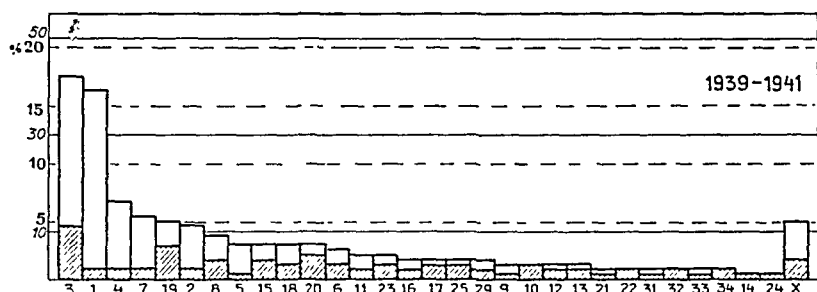


Fig. 2.

240 pneumococcal pneumonias May 1939—May 1941.

The light areas of the diagram represent lobar pneumonia, the streaked parts bronchopneumonia. The X-marked group includes cases where more than one type has been found in the sample, or where the types are overlapping.

The frequency of the various types of pneumococci in 240 cases of pneumococcal pneumonia from the present material will be seen in fig. 2. In this diagram, as in the previous report from the Bacteriological Institute (fig 1) only clinically verified cases of lobar and broncho-pneumonia are recorded.

The distribution of types differs somewhat from that of the previous report from this institute. The more unusual types tend to increase in number. *Asklund, Sjöstedt* and *Vahlne* found in their material that 60 % of all the cases

fall on the four most usual types and 70 % on the seven most common ones. These figures of percentage correspond quite well with those published by *Bullowa* and by *Vammen*. This marked dominance is however somewhat modified in the present material. Thus the four most common types cover only 46 % and the seven most common 59 %. These changes as well as some among the more unusual types cannot however be accorded any definite value as our material is rather scarce. The markedly increased frequency of type 4 ought all the same to be noticed. This type, amounting to only 2,3 % in the earlier report, comes in this material on the third place with 6,7 %. This does not agree very well with *Vammen's* investigation, where type 4 amounts to about 3 %, while *Björnson* on the other hand has type 4 in 7 % of 400 cases of pneumococcal pneumonia.

Of greater interest is the interchange between types 1 and 3. Type 1, which in *Asklund's*, *Sjöstedt's* and *Vahlne's* material amounted to 32 % or 2,5 times as much as type 3, has diminished markedly until 16,7 %. Type 3 has at the same time increased slightly in frequency and amounts now to 17,5 % against the earlier 12,2 %. Such fluctuations in the distribution of the most common types can hardly be ascribed to the smallness of the material, but a real difference must be assumed to exist.¹⁾

These variations might of course be interpreted as a real decrease in the frequency of type 1. Similar frequency-fluctuations have been described by *Bullowa* in a number of types, though not so marked as in the present material, and secondly it seems as if types 1 and 3 have been rather constant. In *Vammen's* latest frequency curve (1940) type 3 predominates much as in our material, but the data cannot all the same be directly compared, as *Vammen* has differentiated his cases according to the samples and not to the

¹⁾ As a matter of fact, the difference between the two series, as determined by means of the χ^2 method, is statistically significant with regard to type 1.

diagnosis. In a following discussion *Vammen* also establishes, supported by a great number of records from different countries, that type 1 seems everywhere to be the most common cause of pneumococcal pneumonia.

Another explanation of the variations in our material may be found in the fact that only selected samples have been sent in for type determination.

As has been mentioned above, 545 sputum samples have been typed at the Bacteriological Institute during the two-year period in question. 351 of these have come from the University Clinics in Lund. According to the yearly reports the average pneumonia frequency at these clinics amounts to about 260 cases per annum. (This figure does not include the cases from the pediatrial and epidemical clinics, as samples from these clinics have not been typed regularly during the period of investigation). The total number of patients treated for pneumonia at the clinics during this period would thus amount to nearly 540, which implicates that only about 65 % of all cases of pneumonia have been determined serologically.

The principles followed in this selection are rather obvious. It seems most likely to assume that it is the easier cases, rapidly reacting on chemotherapy, which have not been typed. As type 1 is generally considered to cause a milder form of pneumonia than type 3, the decrease in frequency of type 1 seems in this way to be satisfactorily explained.

Whether this explanation actually is sufficient to account for the marked decline of type 1 or whether an absolute decrease of frequency has taken place, will probably be definitely settled only by way of continued routine typing of all cases of pneumonia.

59 pneumococc-positive non-sputum samples have further been sent to the Bacteriological Institute during this two-year period. 16 of these were conjunctival secretion, 14 samples from otitis or mastoiditis, 11 cerebrospinal fluid, 7 pleural exsudates and 11 various samples such as autopsy material, kneejoint fluid, peritoneal exsudates etc. The distribution of types within this group is seen from table 2.

Table 2.

59 pneumococc-positive non-sputum samples.

Type	Conjunc- tival Sec- retion	Otitis and Ma- stoiditis	Cerebro- spinal Fluid	Pleural Ex- sudates	Miscel- laneous	Total Cases
1.	—	2	1	2	2	7
3.	5	12	2	1	2	22
4.	1	—	1	—	—	2
5.	—	—	1	—	1	2
6.	3	—	1	—	1	5
7.	—	—	—	—	1	1
8.	—	—	—	2	1	3
11.	1	—	—	—	—	1
14.	1	—	—	—	—	1
15.	—	—	1	—	—	1
18.	—	—	1	—	2	3
19.	2	—	1	1	1	5
20.	1	—	—	1	—	2
23.	—	—	1	—	—	1
27.	—	—	1	—	—	1
28.	1	—	—	—	—	1
33.	1	—	—	—	—	1
	16	14	11	7	11	59

. It may be of interest to record the distribution of types in the whole material determined at the Bacteriological Institute during the period of 4 years, when such determinations have been made here. It is naturally this distribution which finally decides against which types sera ought to be prepared in the first place. For this purpose *Asklund's*, *Sjöstedt's* and *Vahlne's* material has been added to the material here presented, thus making a total of 642 pneumococc-positive samples. The most common types are: type 1: 141 cases (22 %), type 3: 110 cases (17 %), type 7: 36 (5,6 %), type 5: 35 (5,4 %), type 19: 28 (4,3 %), type 4: 26 (4,1 %) and type 8: 24 (3,7 %). The seven most common types thus comprehend 62,1 % of the whole material. As a comparison might be mentioned that in *Vammen's* (1940) material the

seven most common types — 3, 1, 7, 6, 19, 8, 4 — comprise about 62 %; a very good correspondence.

From the facts mentioned above a limitation of eventual supplies of therapeutic antipneumococcic sera at the hospitals approximately to the 7—8 most common types would seem appropriate as these types evidently cover $\frac{2}{3}$ of all pneumococcic infections. This does of course not imply that sera against other types should be inaccessible, but these could very well be stored at a central laboratory and when necessary required from there.

The author wishes to express his gratitude to the foundation Therese and Johan Anderssons Minne for grants which made this investigation possible.

LITERATURE.

- Alwall, N.: *Nordisk Medicin*, IV: 3744, 1939.
 Asklund, N., Sjöstedt, S., Vahlne, G.: *Nordisk Medicin*, V: 412, 1940.
 Björnsson, J.: *Nordisk Medicin*, VIII: 2082, 1940.
 Bullowa, J. G. M.: *The Management of the Pneumonias*. Oxford Med. Publ. 1937.
 Gard, S., Löfström, G., Jacobsohn, G.: *Act. Med. Scand.* Vol. XCV, V: 483, 1938.
 Lindau, A.: *Act. Pat. et Microb. Scand.* Vol. X, fasc. 1, 1933.
 — *Sv. Läkartidn.*, 25, 1939.
 — *Sv. Läkartidn.*, 32, 1939.
 Long, P. H., Haviland, J. W.: *Ann. of Int. Med.* 14: 1042, 1940.
 Vammen, B.: *Ugeskr. f. Læger* 12: 349, 1939.
 — *Pneumokoktypernes forekomst i Danmark*. Ejnar Munksgaard, København, 1940.

STUDIES IN PNEUMOCOCCAL IMMUNITY. II. INVESTIGATIONS OF THE GLOBULIN FRACTIONS OF TYPE I ANTIPNEUMOCOCCIC SERUM.

By *Anders Grönwall* and *Gösta Vahlne*.

(Received for publication April 1st 1942).

During the last years a better insight in the physico-chemical properties of the antibodies has been obtained. The problems here concerned are however far from solved, and only a few antibodies have been closely examined in this respect. The most important results have been won in connection with the intense investigation of the pneumococci and their antibodies. Our present knowledge in this field is thus mainly limited to this species of bacteria.

These investigations confirm the already formed conception of the antibodies as either consisting of proteins or at least occurring in a very stable association with proteins. Thus the experimental work on these problems must be intimately allied to protein-chemical research and must further demand largely protein-chemical methods.

The antibodies to pneumococci have been investigated in immune horse and rabbit sera as well as in convalescence serum from man. The methods usually employed have been ultracentrifugation, electrophoresis, specific precipitation with pneumococci or polysaccharides and various forms of precipitation, such as salting out and dialysis.

The result of such investigations was, somewhat unexpectedly, that immune sera from different species of animals differed principally in certain respects.

Experiments with ultracentrifugation have shown (2, 16, 21, 22, 26, 32) that during immunization of rabbits the normally present serum globulin fraction with molecular weight 165000 increases. In horse serum on the other hand a quite new globulin fraction, not present in normal serum and with molecular weight 990000 is formed during the process of immunization.

This means that the antibody molecule in rabbit serum is about 6 times smaller than in the corresponding horse serum. The capacity of immune sera to enter the tissues and also their combining power seems to be materially influenced by the size of the molecules which may explain certain variations in the effects of immune sera from different animals.

Through electrophoresis of native serum the protein may be split into a number of clearly defined fractions, after *Tiselius* called α -, β - and γ -globulin respectively (12, 28).

Certain changes in the mutual proportions of these three globulin fractions take place during immunization with pneumococcic vaccine. Some variations in this respect between different species of animals have also been observed.

While the γ -globulin in rabbit antiserum (29, 30, 31) is greatly augmented compared with the amount found in normal serum, we find on the other hand in serum from patients, who have recently suffered from lobar pneumonia, (6) that the α -globulin has increased correspondingly. *Tiselius* and *Kabat* (30, 31) further found that in horse serum the antibody protein migrates as an independent fraction between the β - and the γ -globulin. Other authors state however (25) that it entirely follows the γ -globulin. These latter authors state on the contrary that the divergent reports must depend upon for how long time and how often the horses have been used for the production of antibodies.

In immune serum from horse the antibody protein is to be found in the euglobulin and may thus be separated through dialysis.*) Several authors have used this method for the concentration of pneumococcic serum from horse (24).

It has on the other hand been impossible to precipitate the antibody protein from rabbit serum by means of dialysis, as this

*) With pseudoglobulin and euglobulin is meant below — if nothing is said to the contrary — such globulin fractions as are soluble, resp. nonsoluble in distilled water.

procedure, applied on rabbit serum, yields a very little or no amount of precipitated protein. This circumstance is especially stressed by *Goodner and Horsfall* (10) who performed a fractionation of antipneumococcic sera from horse through dialysis, thus separating the euglobulin. These authors did however not succeed in carrying through the same procedure with antipneumococcic sera from rabbit.

The newer and for the immune-chemical research work fundamental investigations by *Björneboe* (4, 5) are of special interest for the study. This author showed that immunization of rabbits with pneumococcic vaccine was followed by an increase of the total protein, depending upon the formation of specific antibody protein. This specific protein forms a part of that protein which is precipitated with 15.2 % sodium sulphate and should thus according to the nomenclature based on salting out correspond to the euglobulin (3, 4, 17, 19, 20).

The results of these investigations are of the greatest theoretical interest. They have further indicated practicable ways for the concentration of sera for therapeutical purposes. It was quite evident already at an early stage of the serum treatment of pneumonia, that this therapy had some drawbacks which might be eliminated through the production of purified and concentrated sera. Among these drawbacks may be mentioned the very great serum quantities necessary to be given and the high frequency of serum sickness.

Of the fractionation methods mentioned above some are scarcely to be thought of in connection with serum concentration on a larger scale, whilst other methods are well adapted for such purpose. It was thus found practical to concentrate horse sera using the precipitate formed when dialysing. When rabbit sera began to be used in the serum therapy it was for reasons mentioned above not possible to dialyse them. Dealing with these rabbit sera it has been found most practical to precipitate the antibody-containing globulin with sodium sulphate and use the precipitate, after it has been dissolved in distilled water and after dialysing away some of the salt (3, 5, 17).

The reason why a dialysis of rabbit serum — contrary to for example serum from horse and man — does not yield any globulin precipitate, seems to be the fact that the globulin is present in rabbit serum in a very stable solution, which depends upon favourable proportions between the various protein fractions.

Cohn and his collaborators have in extensive investigations studied the solubility of ampholytes (aminoacids, peptides and proteins) and especially the solubility of ampholytes in the pre-

sence of other more soluble ones and in the presence of neutral salts. (For literature on these problems see 7 and 13). *Grönwall* (1940) found that for example the solubility of lactoglobulin increased in the presence of easily soluble ampholytes as glycine, its peptides and ovalbumin. In a study of the proteins of horse serum it has further been shown that the solubility of euglobulin was not increased by pseudoglobulin but on the other hand by albumin (13). By removing the solubility-increasing albumin in rabbit serum it ought correspondingly to be possible to reduce the solubility of euglobulin.

The experiments described below also showed that such was the case. In rabbit serum the globulin was first isolated from the albumin through salting out, and it was then possible to split the globulin by means of dialysis into two fractions, of which one was soluble in water and the other was not. The two fractions correspond to pseudoglobulin and euglobulin respectively and will henceforth be called the P- and E-fractions.

In agglutination experiments with homologous pneumococci we found in each of these fractions a different type of agglutination just as in agglutination with O- and H-antigen. In the P-fraction the agglutination was floccular and in the E-fraction granular.

Experiments on the protective effects of the two globulin fractions showed that it was the quantitatively dominating P-fraction that had the principal therapeutic effect. This will be seen from the experimental data given below.

The central problem of our investigations has been the question if it were possible to attain a concentration of rabbit antiserum still stronger than the one described by *Björneboe*. We have in the course of our experiments made some observations of serological and protein-chemical interest, which will be mentioned in this connection.

In an experimental part below a short survey will be given of the methods used in our investigations and in another part an account will be given of the results obtained by us. The various consequences which may be drawn from these results will be discussed under separate headings: some

more generally serological, some purely protein-chemical and some important for the manufacture of purified and concentrated antipneumococcic sera.

Experimental part.

Aiming to find new possibilities of fractioning and concentrating antipneumococcic sera from rabbit, we adopted the following plan for our experiments. (See also scheme fig. 1).

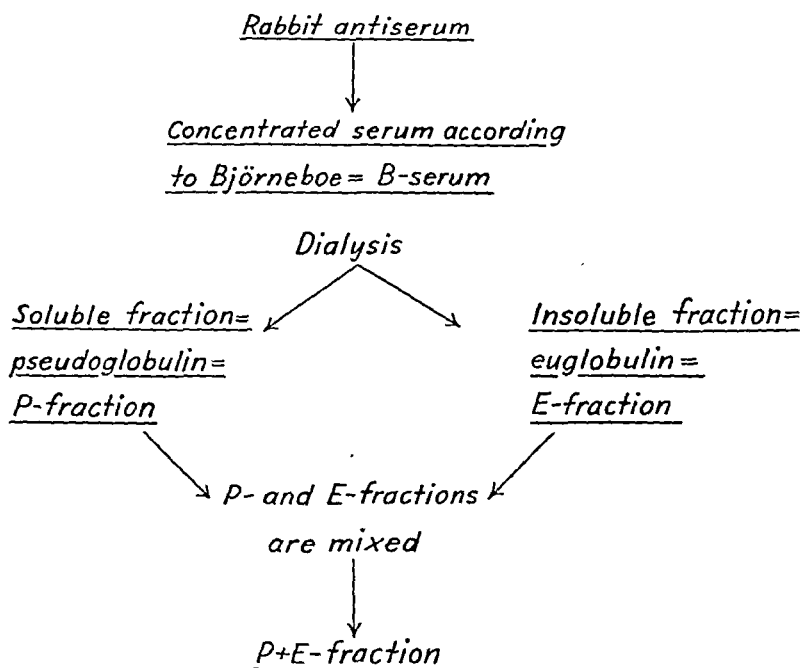


Fig. 1.

I. As original material we used sera containing specific antibody protein against type I pneumococci.

II. These sera were concentrated with *Björneboe's* method (B-serum) (3, 5).

III. The B-serum was dialysed against distilled water. Through this procedure we obtained a precipitate of euglobulin, which was then dissolved in a saline solution to the same volume as before the dialysis (E-fraction). The volume

of the soluble pseudo-globulin fraction (P-fraction) had increased during the dialysis. The increase in volume was determined.

IV. In order to control that no losses in total and antibody protein have occurred during our experiments, we have generally mixed the P- and E-fractions in the same proportions as they have in B-serum (P- + E-fraction).

We determined the total protein in our original material, in B-serum, in P-, E- and P- + E-fractions as well as the antibody protein, which could be adsorbed by homologous pneumococci. For the P-fraction we calculated both the values for the fraction as such and its values when reduced to the original volume. We also considered the dilution caused by dialysis of the P- + E-fraction and these values were recalculated in the same way. By this means we obtained such values for the fractions as could be directly compared with those of the B-serum.

Original material. The sera here employed were of type I and produced according to the experiences of *Kauffmann*, *Björneboe* and *Vammen* (23). For these preliminary experiments we have made use of not very potent sera with relatively low amounts of antibody.

Nitrogen analyses. These analyses were performed with the micro-modification of *Kjeldahl's* method as given by *Andersen* and *Norman-Jensen* (1). The analyzed amounts have been so chosen as to contain about 1—1,5 mg N.

Determination of the specific antibody protein. For this purpose we used *Goodner's*, *Horsfall's* and *Dubos' method* (11), where the antibody protein is determined as the difference in serum protein before and after the adsorption by homologous pneumococci. In details we have followed the directives given by *Björneboe* (5) and by *Kauffmann*, *Björneboe* and *Vammen* (23).

Production of concentrated pneumococcic serum, according to Björneboe. The concentrating method proper will not be dealt with here, as we have used a direct adoption of *Björneboe's* original method (3, 5). This method has in our hands proved fully dependable and given results, correspond-

ing to *Björneboe's* own. The antibody concentration obtained by us is certainly rather low, but this is due to our having used sera with originally low concentrations of antibody. On the other hand we have usually not been able to register any loss of antibody protein, but regained it quantitatively in the concentrated serum.

It is only on a point of lesser importance that we have diverged from *Björneboe's* methods. We did not dissolve the globulin precipitate, obtained through adding 15.2 % sodium sulphate, with distilled water. We have instead centrifuged the precipitate, and then added a small amount of distilled water which made the precipitate somewhat thickly liquide. The preparation was then kept in an ice box at $+4^{\circ}$ C. At this temperature the sodium sulphate crystallized because of its lower solubility at lower temperature, and the globulin fraction dissolved.

Dialysis of serum concentrated according to Björneboe. For dialysis we used cellophane tubes, the porosity of which had been tested in advance through dialysing experiments with serum protein.

They were sterilized in an autoclave in the following way. They were hung up in the autoclave so as not to touch either its bottoms or its walls. When the sterilization was finished, the tubes were not taken out from the autoclave until it had cooled off. If they are taken out when still warm, they dry very quickly, become brittle and burst easily. (27).

The dialysis was performed during 72 hours against running tap water and then during another 72 hours against distilled water.

The cellophane tube was emptied after the completed dialysis and washed out with distilled water. The euglobulin precipitate was centrifuged and dissolved in saline solution together with the euglobulin eventually left on the inside of the tubing.

Before the dialysis chinosol was added to the serum as disinfectant.

»Mouse-protection«-tests have been performed according to Björneboe, (5).

Results.

The first and immediate result of our experiments is that it is possible to precipitate by means of dialysis a nonsoluble euglobulin fraction (E-fraction) from rabbit antiserum, when all the albumin and part of the globulin has been removed from a serum, concentrated according to Björneboe. The theoretical basis for this observation has been discussed in the introduction.

In different examined sera the E-fraction forms a relatively great part of the protein content of the B-serum, generally about 1/3.

The relation between the antibody protein and the total protein is seen from table 1, where the results from some

Table 1.

Experiment Number	P-fraction			E-fraction		
	Total N in mg pr 5 ml	Antibody N		Total N in mg pr 5 ml	Antibody N	
		in mg pr 5 ml	in % of Total N		in mg pr 5 ml	in % of Total N
1	1,30	0,65	50	0,55	0,10	18
2	1,00	0,52	52	0,62	0,10	16
3	1,24	0,61	49	0,70	0,27	39
4	1,75	0,86	49	0,87	0,45	52
5	1,42	0,76	54	0,30	0,09	30

experiments are put together. In the E-fraction the antibody protein forms 16—52% of the total protein, and the corresponding value of the P-fraction is 49—54 %.

The course of the procedure is given in fig. 1. The analytical results of such an experiment are given in tab. 2 (5 similar experiments have been performed and given corresponding results).

Table 2.

	Total N in mg pr 5 ml	Antibody N	
		in mg pr 5 ml	in % of Total N
B-serum	1,79	0,59	33
P-fraction	1,30	0,65	50
E-fraction	0,55	0,10	18
P+E-fraction	1,79	0,70	38

When comparing the analytical results from B-serum, P-, E- and P- + E-fractions it will be seen that the fractionation procedure here employed does not imply any loss of antibody protein. With regard taken to the experimental errors one finds as much antibody protein in the P-fraction as in B-serum. The total amount found in P- and E-fractions surpasses slightly that found in B-serum. In the P- + E-fraction as much antibody protein is found as in the P- and E-fractions together and thus slightly more than in B-serum.

The cause of this apparent increase of antibody protein, observed in nearly all our experiments, needs closer discussion. One has to take into account that too low values may be obtained from the original serum and from B-serum and that we on the other hand may get too high values with our fractions. A circumstance which might influence the results in this direction is the different composition of serum and of our fractions. The absence of solubility-increasing protein fractions as albumin and pseudoglobulin in the latter diminishes the stability of dissolved globulin and may effect an augmented precipitation when adsorbed with pneumococci. Another and perhaps more probable explanation is the following. With the method here used for the determination of antibody protein only one adsorption with pneumococci is made, whilst *Björneboe* (5) makes repeated adsorptions. According to *Björneboe* one may with one single adsorption obtain 0—8 % lower values than with two. Thus a certain source of error may have been introduced in our experiments,

especially as the conditions for a quantitative adsorption have been greater with the P- and E-fractions than in whole serum and in B-serum.

When agglutinating with homologous pneumococci our sera generally agglutinate in dilutions up to 1:320. We have determined the agglutination titer of the P- and E-fractions in special experiments. These experiments showed that the P-fraction had the same titer as the original serum, and that the E-fraction had a considerably lower titer. In one experiment, where the serum agglutinated in dilution 1:320, the values in the P- and E-fractions were 1:320 and 1:40 respectively.

The agglutination with the P- and E-fractions were of quite different types, in the former case it was floccular and in the latter granular.

»Mouse-protection«-tests have shown that the P-fraction has a protective effect of the same order and in any case not less than that of serum. Also the E-fraction has a certain though small protective effect. A closer report of these observations will be given in a following paper.

DISCUSSION.

Serological remarks.

It has been shown that both the pseudo- and the euglobulin fractions of rabbit antisera contain antibody protein, which reacts with and agglutinates homologous pneumococci.

It is naturally of the greatest importance to find out which of the antigen substances in the pneumococci that corresponds to the antibody fractions here described. These questions are being investigated at the moment, and the results will soon be published.

Björneboe (5) showed that the agglutination titer and the protective effect of serum run parallel during immunization. These two properties and the content of antibody protein, precipitable with homologous pneumococci do however not

run parallel. Thus the protective effect and the agglutination titer per unit antibody nitrogen is less in the beginning of immunization than later. This is interpreted by *Björneboe* as due to an increased effectivity of the anti-body protein during immunization. This phenomenon may be explained partly from the different protective effect of various antibody fractions and partly from the circumstance that they do not develop parallelly. That the former explanation is valid is shown by our »mouse-protection«-tests, mentioned above.

Protein-chemical notes.

Björneboe has found that the type-specific antibody protein of rabbit antiserum may be precipitated by adding 15.2 % sodium sulphate. According to the common terminology based on precipitation with neutral salts this means that it belongs to the euglobulin fraction. This observation is fully verified by our experiments.

We further find that the precipitate thus obtained may be split in two fractions by means of dialysis — one soluble in distilled water and the other nonsoluble. When using the nomenclature based on water solubility these two fractions correspond to pseudoglobulin and euglobulin respectively. The two different definitions of euglobulin thus do not cover each other. This is in itself not remarkable but corresponds quite well with earlier experiences. We may here refer to *Sørensen's* classical studies of the serum proteins. There was thus nothing else to expect than that precipitation with 15.2 % sodium sulphate should give a mixture of pseudo- and euglobulin.

It is however more remarkable that *Björneboe* finds the antibody protein in the globulin fraction (= euglobulin), which is the easiest precipitable with neutral salt, while we find the distribution described above with the main part in the globulin fraction, soluble in water (= pseudoglobulin). If the antibody protein is a part of that globulin which is easiest precipitable with salt, one should have expected that

it ought at least mainly to be found in the fraction which is easiest precipitable by dialysis. As this does not seem to be the case the explanation must be the incompatibility of the two definitions of euglobulin.

It must further be pointed out that there is theoretically no reason to expect the same result of a precipitation of serum globulin by dialysis as of a salting out. The former procedure depends upon that the solubility of the globulin diminishes with the decreasing salt concentration, a phenomenon which may be explained through the modern solubility theory.

Precipitation with neutral salts is on the other hand of quite another physico-chemical nature. This procedure was first explained by *Hofmeister* (18) as depending upon that the salt ions attract the water and thus rob the protein molecules of their solvent. *Debye* (8) has later given this theory a more modern form.

Thanks to the results won by earlier authors and those here reported the specific antibody protein in antipneumococcic sera from rabbit can thus be characterized through the following physico-chemical properties:

- 1) It has the same molecular weight when determined by ultra-centrifugation as the normal serum globulin.
- 2) It migrates with the γ -fraction in electrophoresis.
- 3) When precipitated with sodium sulphate it follows the easiest precipitable globulin.
- 4) In globulin, precipitable with 15.2 % sodium sulphate, it is found in both the pseudo- and the euglobulin fraction.

Notes on the concentration of antipneumococcic sera.

Referring to reasons given in the introduction the question of concentrating pneumococcic sera from horse will not be argued here, but instead only the problem of concentrating such sera from rabbit. Several studies concerning the concentration of the latter type of serum have been published. Among these only such have had any practical importance as are based on the salting out procedure. (3, 17). We have

here followed the method devised by *Björneboe*, which seems to be the most perfected. With this method *Björneboe* claims to have obtained sera where 50% of the protein consisted of specific antibody protein.

This implies that if one starts with a serum containing 12 mg total nitrogen per ml ($= 7.5\%$ protein) and 2 mg antibody nitrogen ($= 1.2\%$ antibody protein) one should by means of *Björneboe's* method be able to obtain a concentration of antibody protein thrice as big as that of the original material.

As it is possible to liberate such a serum from some of the protein through dialysis without losing the antibody protein, this must mean a possibility of still higher concentration. If the thus removable part forms about 30 % of the total protein in a B-serum this must imply that the concentration of antibody protein may be augmented from 50 to well over 70 % of the total protein.

It is easy to evaporate a therapeutic serum to 12 % total protein. If a serum is first purified according to *Björneboe* and then dialyzed as described above and finally concentrated so that it contains 12 % total protein, it might be calculated to contain 8.4 % antibody protein or 1.3 % antibody nitrogen. As 1 mg specific antibody nitrogen corresponds to 1100 international units such a serum should contain 14000 I.U. per ml. About 15 ml. of this serum should thus hold the therapeutic dose of 200000 I.U.

The colouring and viscosity of especially the untreated immune serum but also of the B-serum is rather obvious as well as their liability to grow turbid after being stored for some time. The P-fraction on the other hand is nearly colourless and gives an almost water-clear solution without any marked tendency to flocculation.

Summary.

1) It has been shown that it is possible to obtain a precipitate of euglobulin through dialyzing antipneumococcic sera from rabbit, if the albumin and some of the globulin first have been removed by salting out.

2) The antibody-containing globulin, obtained from pneumococcic sera from rabbit through precipitation with 15.2 % sodium sulphate, can thus by means of dialysis be split in one euglobulin- and one pseudoglobulin fraction, of which both contain antibody.

3) With homologous pneumococci agglutination can be obtained with both these fractions. The agglutination in the pseudoglobulin fraction is floccular and in the euglobulin fraction granular.

4) The content of total protein and antibody protein of both these fractions as well as their agglutination titer and their protective effect in »mouse-protection«-tests have been investigated.

5) The fractionation here reported is of importance for the production of concentrated pneumococcic sera, as it makes a higher concentration possible than that obtained by *Björneboe's* method.

6) On the basis of the observations here reported of the fractionation of globulin in rabbit sera the question of the relation between such globulin fractions is discussed as are defined either by solubility in concentrated solutions of neutral salts or by solubility in distilled water.

The authors wish to express their gratitude to the foundation »Therese and Johan Anderssons Minne« for grants which made this investigation possible.

LITERATURE.

- 1) *Andersen, A. C.* and *Norman-Jensen, B.*: Z. f. analyt. Chemie. 83, 114, 1930.

- 2) *Biscoe, J., Heriik, F. and Wyckoff, R. W. G.*: Science 83, 602, 1936.
- 3) *Björneboe, M.*: Z. f. Hygiene, 121, 59, 1938.
- 4) — J. Immunology, 37, 201, 1939.
- 5) — Agglutininproteinet i Kaninpneumococcsera (Diss.). Köpenhamn 1940.
- 6) *Blix, G.*: Hygiea 100: 2, 77, 1938.
- 7) *Cohn, E. J.*: Harvey Lectures, 1938/39, 124, 1939.
- 8) *Debye, P.*: Z. physik. Chem., 130, 56, 1927.
- 9) *Gerlough, T. D., Palmer, J. W. and Blumenthal, R. R.*: J. Immunology 40, 53, 1941.
- 10) *Goodner, K. and Horsfall, F. L.*: J. exp. Med. 66, 413, 1937.
- 11) — and *Dubos, R. J.*: J. Immunology, 33, 279, 1937.
- 12) *Grönwall, A.*: Kungl. Fysiograf. Sällsk. Förh. Bd. 5, Nr. 13, 1935.
- 13) — Globuliners löslighet i närvaro av lättlösliga Zwitterjoner (Diss.), Lund 1940.
- 14) *Heidelberger, M. and Kabat, E. A.*: J. exp. Med. 63, 737, 1936.
- 15) — — ebenda, 67, 545, 1937.
- 16) — and *Pedersen, K. O.*: ebenda, 65, 393, 1937.
- 17) — *Turner, J. C. and Soo Koo, C. M.*: Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 37, 734, 1938.
- 18) *Hofmeister, F.*: Arch. exp. Path. Pharm. 24, 247, 1887.
- 19) *Homer, A.*: Biochem. J. 13, 278, 1919.
- 20) *Howe, P. E.*: J. biol. Chem. 49, 93, 1921.
- 21) *Kabat, E. A.*: J. exp. Med. 69, 103, 1938.
- 22) — and *Pedersen, K. O.*: Science, 87, 372, 1938.
- 23) *Kauffmann, F., Björneboe, M. and Vammen, B.*: Z. Hygiene 121, 36, 1938.
- 24) *Klobusitzky, D. von*: Erg. Hygiene Bakteriologie 23, 238, 1939.
- 25) *Moore, D. H., van der Scheer, J. and Wyckoff, R. W. G.*: J. Immunology 38, 221, 1940.
- 26) *Svedberg, T. and Pedersen, K. O.*: Die Ultrazentrifuge, Dresden u. Leipzig. 1940. S. 364.
- 27) *Thalhimer, W.*: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 37, 639, 1938.
- 28) *Tiselius, A.*: Biochem. J. 34, 313, 1464, 1937.
- 29) — J. exp. Med. 65, 641, 1937.
- 30) — and *Kabat, E. A.*: Science 87, 416, 1938.
- 31) — — J. exp. Med. 69, 119, 1939.
- 32) *Wyckoff, R. W. G.*: Science 84, 291, 1936.

STUDIES IN PNEUMOCOCCAL IMMUNITY III. DETERMINATION OF THE RESISTANCE OF PNEUMO- COCCI TO SULPHAPYRIDINE.*)

By S. Sjöstedt, G. Vahlne and N. Berg.
(Received for publication April 1st 1942).

The epoch-making effect of the derivatives of sulphanilamide on different infections is acknowledged everywhere. The action of these drugs is, however, still unexplained, as well as the reason why in some cases the desired therapeutic effect is not obtained. Thus there are good reasons for further investigations of this latter question from both the theoretical and practical point of view.

In spite of the considerable decrease of pneumonia mortality, brought about through treatment with sulphapyridine the mortality rate is still rather high. Every clinician with large experience of pneumonia thus encounters a greater or smaller number of cases which in spite of sulphapyridine treatment, performed *lege artis*, still lead to complications or death. In these cases a completing serum treatment is indicated. According to Long and Haviland (5) this is the case in 10—15 % of pneumonias. The unsatisfactory effect of the sulphapyridine treatment met with in some cases of pneumonia may be due to different underlying causes.

*) The present study was begun in 1940 and completed during the first months of 1941, but its publications has been delayed owing to the illness and death of our former translator.

1) The sulphapyridine concentration in the blood may remain unsatisfactory because of deficient resorption e. g. repeated vomitings.

2) The sulphapyridine may acetylate too quickly and thus change into a form not active on the pneumococci but toxic to the patient.

3) A patient may be intolerant to treatment (agranulocytosis, haematuria, drugfever, exanthema etc.).

4) A pneumonia patient in bad general condition may lack the power of mobilising the proper defensive forces of the body (formation of antibody etc.) which nevertheless — in spite of the chemotherapy itself — still seems to be of decisive importance for the final destruction of pneumococci.

5) In several cases the missing effect depends upon the fact that the strain of pneumococcus which has infected the patient is resistant to the effect of sulphapyridine (chemoresistant strain).

It is chiefly this last point that has been the object of our interest in this investigation.

That various strains of pneumococci have not the same sensitivity to sulphapyridine has been shown by experiments on animals and by *in vitro* experiments by Kai Schmith and others. This investigator has also shown that as to sensitivity to sulphapyridine there is parallelism between *in vivo* and *in vitro* experiments.

In experiments on animals the variations in resistance to sulphapyridine have been successfully shown by, among others, Colin MacLeod and Daddi (8), Kai Schmith (13) and Schmidt, Clausus and Starks (10). The above-mentioned authors have all infected two series of mice, the one with a sensitive strain and the other with a strain of pneumococci resistant to sulphapyridine. The strains have had the same virulence in relation to mice and the injected doses have corresponded to each other. Both series have then been treated with the same amounts of sulphapyridine under similar circumstances. The mortality has been considerably higher in the animals infected with pneumococci resistant to sulphapyridine.

It is because of the last-mentioned circumstances of great therapeutical interest that determination of the resistance of

pneumococcus to sulphapyridine is performed already at the beginning of a case of pneumonia. If the resistance is then found to be too high a serum treatment may be advisable and started in time.

Methods for determination of resistance in vitro.

MacLeods (7) reports that, using a method developed by *Penfold* (9), he has been able to show that strains resistant to sulphapyridine are more apt to form hydrogen peroxide than the chemo-resistant ones. By growing pneumococci on blood agar plates, containing benzidine, it is possible to decide which pneumococci form hydrogen peroxide. These strains give black colonies after having grown for 16–24 hours on this medium, while the strains that form no or nearly no hydrogen peroxide at this time give brown colonies. *Schmidt, Sesler and Green* (11) have also investigated the power of forming hydrogen peroxide in both sensitive and resistant strains of pneumococci, but have not found any difference between them in this respect. We have also made a number of experiments on benzidine plates with both resistant and sensitive strains of pneumococci. The method has, however, not given any satisfactory results in our hands, and we have not been able to obtain any significant differentiation between more or less resistant strains.

MacLean, Rogers and Fleming (6) have investigated the sensitivity of different pneumococcal strains by means of the »slidecell technic« and found that the sensitivity varies with different strains. They cultivated the bacteria in a chamber containing equal parts of defibrinated blood and sulphapyridine (1:20000) in saline. Bacterial cultures in serial dilutions were added to this mixture, and the number of bacteria was determined after incubating for 24 hours. As the bactericidal effect of blood itself is rather great, controls with only blood and saline have to be included, and the results of these two series compared. Sources of error with this method are firstly the variations in the bactericidal effect of the blood and secondly the varying sensitivity of different pneumococci to this effect. Consequently these results are rather difficult to interpret.

Kai Schmith (13) makes use of 5% serum broth to which sulphapyridine is added in falling doses from 1:5000 to 1:640000. A number of bacteria varying between 2000 and 20000 is added to tubes containing 5 ml. such broth. If the number of bacteria inoculated is greater than two million, growth develops in all the

concentrations. After 24 hours the tubes are controlled in order to see if some of them have grown turbid, and from all the tubes cultures are prepared on blood agar plates in order to ascertain which tubes have become sterile. After another 24 hours the tubes are controlled again. By establishing the concentrations in which pneumococci had not grown after 24 and 48 hours respectively, a numerical expression of the sulphapyridine sensitivity is obtained. *Schmith* has investigated about 240 strains of pneumococci belonging to different types. The resistance of most of the strains lies between 1:20000 and 1:80000, but there are variations from 1:5000 to 1:640000. No significant difference between the various types of pneumococci has been observed.

In order to investigate the resistance of gonococci to sulphapyridine *Kai Smith* and *E. Reymann* (14) use a method with solid media. Sulphapyridine in concentrations from 1:5000 to 1:1280000 is added to ascitic agar plates and on these plates a rather dense suspension of gonococci is smeared. The plates are controlled after 24 and 48 hours, and the sensitivity to sulphapyridine is given as the highest sulphapyridine concentration on which the gonococci grow. *Domagk* (2) has used blood agar plates with added chemotherapeutics in order to determine the sensitivity of streptococci, but abandoned this method later on as corresponding too little with the results of animal experiments.

Finally a method worked out by *G. Hagerman* at the Bacteriological Institute of Lund ought to be mentioned. It was first reported by the author at the session of Lunds Läkarsällskap January 1941 (18). *Hagerman* drips sulphanilamide, sulphapyridine or sulphathiazol solutions of different concentrations on blood agar plates and leaves them to dry. A certain amount of pneumococci is then smeared over the whole plate. By examining the plates and recording where growth has been inhibited in the area of the above-mentioned drops of chemotherapeutics a relative measure of the sensitivity to sulphapyridine is obtained. This method has also been used with gonococci, meningococci and haemolytic staphylococci.

On the basis of the above methods and investigations of our own we have worked out a method to determine the resistance to sulphapyridine of the pneumococci. We have used blood agar plates containing various quantities of sulphapyridine, recording the highest concentration of sulphapyridine that does not inhibit growth of pneumococci in 24 hours at 37° C.

The elaboration of our method

As culture media rabbit or sheep blood agar plates have been used, containing 4 % blood, 1 % peptone Chapoteaut and sulphapyridine in the concentrations 1:5000 to 1:640000. In a few cases the concentrations 1:2500 and 1:1280000 have been employed. Blood agar plates without sulphapyridine have been used as controls. Sheep blood has turned out to be superior to rabbit blood, as the colonies of pneumococci grow better on sheep blood agar. The authors have recorded the highest sulphapyridine concentrations at which the pneumococci attained full growth after incubating for 24 hours at 37° C.

Colebrook, Buttle and O'Meara (1) stressed already in 1936 the great importance of the amount of the inoculated bacteria. For this reason the first step has been to determine the influence of the density of growth on the plates. A serial dilution was prepared from a broth culture and from these dilutions blood agar plates containing sulphapyridine, as well as control plates without sulphapyridine were inoculated. The result of such an experiment is seen from the table below.

Table 1.

Dilution of broth culture	Amount of sulphapyridine								Control plate. Number of colonies.
	1:5000	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000	1:160000	1:320000	1:640000	
10 ⁰	+	+	+	+	+	+	+	+	∞
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	∞
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+	∞
10 ⁻³	—	—	—	+	+	+	+	+	∞
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	+	+	+	2000
10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	+	+	+	180
10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	+	+	+	25
10 ⁻⁷	—	—	—	—	—	+	+	+	2

For the explanation of this table see the text.

As is seen, the amount of inoculated bacteria affects the possibility of using this method. If the inoculated doses are very great, growth is obtained even with the highest concentrations of sulphapyridine. With lesser doses and smaller number of colonies it is possible to observe an inhibition of growth on media containing sulphapyridine. It has been shown by repeated experiments that this inhibition of growth is most easily observed if the number of colonies on an 80 cm² plate is less than 400.

The importance of the percentage of peptone in the medium has also been investigated. On plates with no peptone the colonies of pneumococci attain full growth more slowly, so that the plates cannot be read off until after 48 hours. The pneumococci in these experiments have, however, been able to grow at the same sulphapyridine concentrations as on the plates with peptone — a somewhat astonishing result considering the reports given in the literature (*Lockwood, Lynch, Stamp, et al.*) that peptone diminished the growth-inhibiting effect of sulphapyridine. In some cases an even greater sulphapyridine resistance was found on the plates without peptone. This might, however, be explained by the longer time of growth (48 hours), during which the pneumococci have had a greater chance of overcoming the inhibiting effect of sulphapyridine. This result seems to indicate that the antagonistic effect of peptone on sulphapyridine is probably only apparent. By means of the added peptone the medium is so much enriched that the pneumococci grow more easily and the growth-inhibiting effect of the sulphapyridine seems to be neutralized in this way.

We have also tested the influence of some other factors. The use of blood agar plates stored for 1 to 14 days does not affect the results. Nor is the age of the culture — from 5 to 20 hours — significant. As mentioned above, only the number of bacteria is to be regarded.

One and the same strain has been tested firstly after series of mouse-passages, secondly after being cultivated in broth for several weeks, and thirdly after growing for genera-

Table 2.

Dilution of broth culture	Amount of sulphapyridine								Control plate. Number of colonies.
	1:5000	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000	1:160000	1:320000	1:640000	
10 ⁻²	—	+	+	+	+	+	+	+	∞
10 ⁻³	—	—	+	+	+	+	+	+	∞
10 ⁻⁴	—	—	—	—	+	+	+	+	36
10 ⁻⁵	—	—	—	—	+	+	+	+	3

One of our serial experiments for determining the resistance to sulphapyridine.

tions on blood agar plates and the same chemo-resistance has been observed in all cases. These experiments have all been performed with type IN (Neufeld), that is with a strain that has not earlier been exposed to sulphapyridine treatment.

Supported by these experiments we have made use of the following technique in order to compare the sulphapyridine sensitivity of different strains. In order to get a suitable number of colonies on the plates, these have been divided into four quadrants and each quadrant has been smeared with different dilutions from the culture whose resistance to sulphapyridine is to be determined. The dilutions have generally been 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ and 10⁻⁶. After incubating for 24 hours at 37° C. the growth — or absence of growth — on the different quadrants has been recorded and the results arranged in tables. The number of colonies on each quadrant of the control plate has been counted up to 200. A greater number of colonies has for practical reasons been marked as infinite. In order to gauge the resistance to sulphapyridine only those quadrants where the diluted cultures gave a growth of 100 — 10 colonies have been considered. A minimum of colonies — 10 — has been decided upon in order to avoid the error which may occur when inoculating only quite a small number of bacteria. As a measure of resistance we have

then taken the highest concentration of sulphapyridine on which the pneumococci have been able to grow. In the table below, which exemplifies a result obtained by means of this method, the sulphapyridine resistance is thus 1:80000.

One of the drawbacks of this method lies in the choice of suitable dilutions of broth culture so that an adequate number of colonies is procured. In order to facilitate this, regular determinations with nephelometer of the density of the mother culture have been made. When the age of the culture and its normal growth curve, measured with the nephelometer, are known, it is possible to determine the number of bacteria in the culture so exactly that only one dilution is necessary when smearing the plates. Even without determining the density it is not necessary to make four dilutions, provided that the age of the broth culture and the doses of inoculation are kept fairly constant. Even without determining the density only two dilutions are needed with some experience of the method.

Resistance determination on a number of pneumococcal strains of various types.

The material consists of some of the strains of pneumococci which have been cultivated from sputa, various exudates etc., which have been received at the Bacteriological Institute of Lund for typing. For the composition of this material we refer to *O. Möller* (19).

We have investigated 62 strains of 23 types. The results are seen from the table below.

If the results are tabulated irrespective of type the following diagram is obtained.

We have thus found that the majority of pneumococci have a resistance of 1:80000 and 1:160000. For the rest the resistance of different strains of pneumococci varies from 1:5000 to 1:2560000. It is scarcely possible to draw any conclusions as to the general difference in resistance of the various types, as our material is not very great.

Table 3.

Type	Resistance to sulphapyridine								
	1:5000	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000	1:160000	1:320000	1:640000	1:1280000
I	—	—	—	1	5	4	3	—	1
II	—	—	—	—	—	1	1	—	—
III	1	1	—	—	1	7	—	2	—
IV	—	—	—	—	—	1	—	—	—
V	—	—	—	—	2	—	—	1	—
VI	—	—	1	—	1	1	—	—	—
VII	—	—	1	—	1	1	—	—	—
VIII	—	—	—	—	1	—	2	1	—
IX	—	—	—	—	—	1	1	—	—
XI	—	—	—	—	—	—	—	—	—
XII	—	1	—	—	—	1	—	—	—
XV	—	—	—	—	—	1	—	—	—
XVI	—	—	—	—	—	1	—	—	—
XVII	—	—	—	—	—	1	—	1	—
XIX	—	—	1	—	—	—	1	1	—
XX	—	—	—	—	—	—	—	1	—
XXII	—	—	—	—	—	1	—	—	—
XXIII	—	—	—	—	1	—	—	—	—
XXV	—	—	—	—	—	—	—	1	—
XXVII	—	—	—	—	—	1	—	—	—
XXIX	—	—	—	—	—	—	1	—	—
XXXIII	—	—	—	—	—	—	—	—	—
XXXIV	—	—	—	—	1	—	—	—	—
Total	1	2	5	4	16	20	9	3	1

Fig. 1.

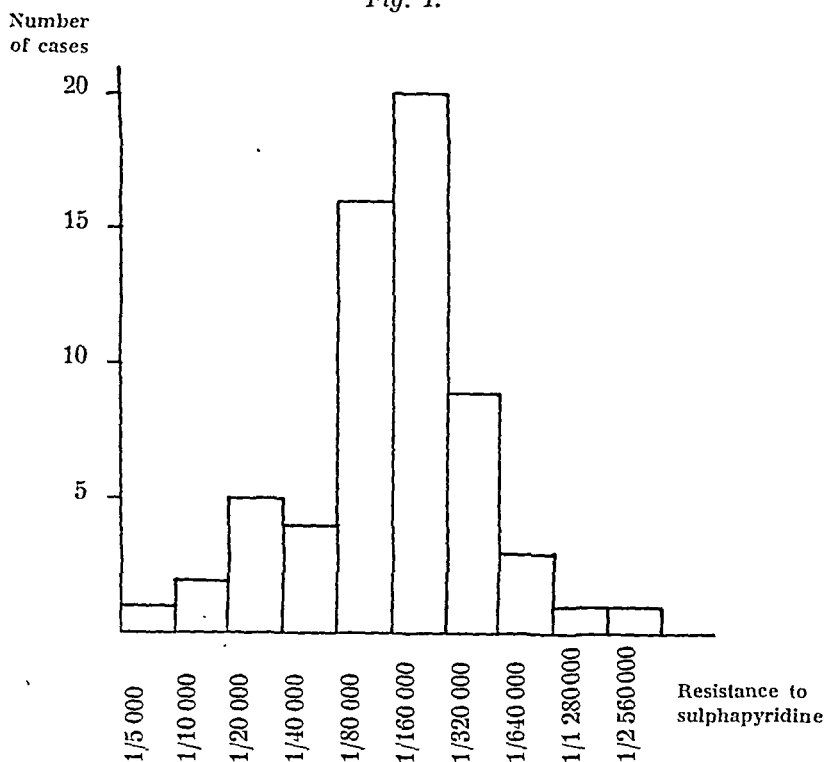


Diagram for the resistance to sulphapyridine of 62 pneumococcal strains.

The clinical significance of determinations of chemo-resistance.)*

A question of central importance is how the patients, from whom the sulphapyridine-resistant strains have been isolated, respond to chemo-therapeutical treatment. As is seen from table 3, 12 strains of pneumococci have shown a resistance of 1:40000 or more, viz. two type 3 and one each of types 1, 6, 7, 8, 12, 19, 23, 25, 29, 34. One of the strains from type 3 originates from the time before the introduction

*) This problem is more closely dealt with in the authors' article in *Nordisk Medicin* (Swedish), p. 1696, Bd. 14, 1942.

of the sulphapyridine therapy, and is thus of no interest in this connection. If one examines the course of disease in the 11 other patients, all of whom have been treated *lege artis* with sulphapyridine or sulphathiazol, one finds that a regular crisis has set in only in one patient, while 6 cases have had a fatal issue and 4 cases have shown various complications, directly caused by the pneumococci. Of the cases with fatal issue 4 suffered from pneumonia, 1 from pneumococcal endocarditis and in 1 case pneumonia could not be verified.*) Of the complicated cases two got empyema, 1 migrating pneumonia with pleuritis, and 1 case a recidivation of pneumonia. In the last case the temperature fell critically after repeated treatment with sulphapyridine.

We should like to call attention to the fact that an infection with a strain of pneumococcus resistant to sulphapyridine has a very grave prognosis in spite of chemotherapeutical treatment, administered *lege artis*. A determination of the sensitivity to sulphapyridine of the pneumococci would thus give valuable hints as to the prognosis and be able to show in which cases an additional serum treatment is indicated.

Can the pneumococci change their chemo-resistance?

Another question of both clinical and theoretical interest is whether the pneumococci can change their sensitivity to sulphapyridine. From the clinical point of view there are above all two central questions:

1) Can the pneumococci during treatment with sulphapyridine increase their resistance to sulphapyridine so much that the therapy fails for this reason?

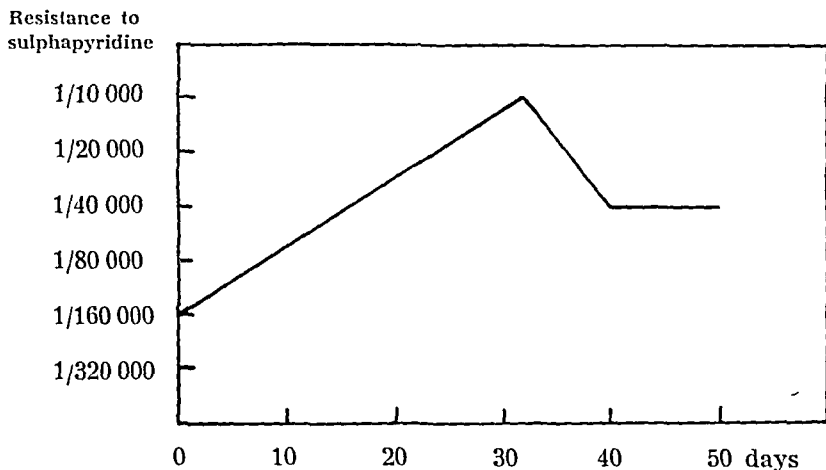
2) Is it possible that a general treatment of pneumonia

*) When X-rayd the patient showed a consolidation of the lungs. At the autopsy, a few days later, no pneumonia could be found, however. The consolidation was considered due to atelectasis of the lungs. The final diagnosis was heart failure and influenza.

with sulphapyridine may result in a generally increased resistance of pneumococci and thus diminish the future value of the sulphapyridine treatment?

The answer to the first question — whether pneumococci can change their resistance to sulphapyridine — must be affirmative. This can be shown both *in vivo* and *in vitro*, both

Fig. 2.



Variation of the resistance to sulphapyridine of a clinical case (S. W.), during treatment with sulphapyridine. Type 12 (949).

clinically and experimentally. In animal experiments the resistance to sulphapyridine may be increased by passing the pneumococci through mice treated with sulphapyridine. Already after three to six mouse passages *Colin MacLeod* and *Daddi* (8), *MacLean, Rogers* and *Fleming* (6) and *Kai Schmith* (13) were able to prove an increased resistance to sulphapyridine. In one clinical case which we followed with determinations of resistance during treatment, this resistance increased from 1 : 160 000 to 1 : 10 000, and during this time the patient developed an empyema (see fig. 2). It may of course be possible that one or more of the resistant strains which we have found have acquired this resistance to sulphapyridine during treatment. The sputa are often not sent in

until the patient has been treated for some time with sulphapyridine.

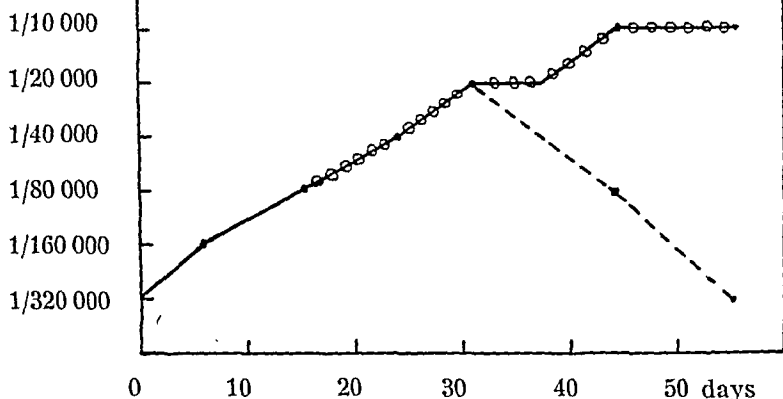
It is thus indubitable that a strain of pneumococci in a patient with pneumonia is able to change its resistance during treatment. It is of vital interest for the treatment to know how quickly this takes place. We have no case which demonstrates this, but comparison with experiments *in vitro* may, however, give points of view. These experiments have been performed in the following way: A large dose of pneumococci of type I Neufeld (IN) was added to ascites broth, containing sulphapyridine in the concentration 1 : 10 000. The culture generally attained full growth in 24 hours and it has thus been possible to make a new inoculation every day. After 15 days the percentage of sulphapyridine was increased to 1 : 5 000. We now found that the resistance had increased successively from 1 : 320 000 to 1 : 10 000 during 44 days (see fig. 3). Similar experiments have been performed by MacLeod and Daddi (8) with the same results. In broth containing sulphapyridine we have, with small doses of pneumococci, been able to obtain delayed growth, and at the same time a rapid change in the resistance to sulphapyridine. After 55—60 hours' growth in broth containing sulphapyridine in the proportion 1 : 10 000 the resistance of a pneumococcal strain of type 4, normally 1 : 1 280 000, has increased to 1 : 80 000. In similar experiments Kai Schmith (13) has found a moderate increase in resistance after 72—120 hours' action of sulphapyridine on pneumococci. After repeated subcultures in broth and with progressive concentrations of sulphapyridine, he has been able to demonstrate a very considerable increase in resistance. His experiments have been performed with six different strains and similar results, and it is especially interesting to notice that one of these is the one used also by us — the IN-strain.

We must thus conclude that a change in resistance may take place quickly — in two to three days — and it is not improbable that this corresponds to similar circumstances *in vivo*.

The results of these experiments correspond well with the clinical experience that sulphapyridine and similar drugs ought to be given in maximal doses from the beginning. If not, it is possible that a low initial dose may cause an increase of the resistance to sulphapyridine of the pneumococcal strain, with accompanying failure of the therapy

Fig. 3.

Resistance to sulphapyridine



Variation of the resistance to sulphapyridine of type I N. after having been cultivated in sulphapyridine-containing broth.

— Pneumococcal broth containing sulphapyridine 1/10000.

—○—○— — — — — 1/5000.

--- without sulphapyridine.

when the maximal dose is given later on. A clinician may thus on account of »cautious dosing« at the beginning of the disease cause the therapy to fail, when later the optimal dose is given.

The second question — whether the number of strains resistant to sulphapyridine will increase, depends upon whether the pneumococci which have acquired resistance to sulphapyridine, can again become more sensitive. In two experiments, one *in vivo* and one *in vitro*, this is found to be possible. The clinical case (type 12) related earlier, where

the resistance was increased during the treatment from 1 : 160 000 to 1 : 10 000, has been followed also after the end of the sulphapyridine treatment. Already 8 days later the resistance to sulphapyridine had diminished to 1 : 40 000 (see fig. 2). Cultivation of pneumococcal strains, the resistance of which has increased during the treatment with sulphapyridine, have also later on led to a diminished resistance. One strain (type 3) thus diminished its resistance from 1 : 10 000 to 1 : 80 000 after being subcultivated daily in ascites broth. The IN-strain, which increased its resistance in *in vitro* experiments from 1 : 320 000 to 1 : 10 000, was then left to grow in normal ascites broth during 13 subcultures. During this time the sulphapyridine resistance fell to 1 : 80 000 and after another 12 subcultures the sensitivity had attained the initial value — 1 : 320 000 (see fig. 3). It thus seems as if a pneumococcal strain which has acquired a certain resistance may again lose its resistance and eventually return to its original value, when no longer under the influence of sulphapyridine. *Kai Schmith* (13) did not find any such decrease of resistance. When a strain experimentally resistant to sulphapyridine is transplanted into surroundings free from sulphapyridine, he finds in some cases only a slight decrease of resistance, and after this the resistance remains constant within the variations which his methods normally show. In other strains he does not find any decrease of resistance at all. This difference may perhaps be explained by the fact that we have used large doses for all subcultures, whereas *Kai Schmith* has used doses varying between 1 000 and 100 000 pneumococci.

It is also a problem whether the varying sensitivity of pneumococci is a phenomenon caused by the sulphapyridine treatment introduced during the last years. A few pneumococcal strains, preserved before the beginning of the sulphapyridine therapy, have been revived and examined by us, and their sulphapyridine resistance has also been found to vary, with its highest value at 1 : 40 000.

Summary.

1) For the determination of the resistance of pneumococci to sulphapyridine the authors use blood agar plates containing sulphapyridine. As a measure of the resistance to sulphapyridine the authors have chosen the highest concentration of sulphapyridine in which pneumococci are able to attain full growth during 24 hours.

2) The authors have investigated the importance of the inoculated amount of pneumococci and found that constant values of the resistance to sulphapyridine are obtained, when the number of colonies on a blood agar plate of 80 cm² is less than 400.

3) 62 strains of 23 types have been investigated, and the resistance to sulphapyridine has varied between 1:5 000 and 1:2 560 000.

4) The authors are of the opinion that a determination of the resistance of pneumococcal strains to sulphapyridine is of great prognostic value. Among 10 patients with pneumonia and a resistance to sulphapyridine of 1:40 000 or more, only one had a normal crisis, 5 died and 4 got complications.

5) Pneumococci may increase their resistance to sulphapyridine both *in vivo* and *in vitro*. As this change may occur quickly the authors stress the importance of beginning the treatment with optimal doses.

6) Pneumococci which have acquired resistance to sulphapyridine may again increase their sensitivity to sulphapyridine both *in vivo* and *in vitro*.

The authors wish to express their gratitude to the foundation Therese and Johan Anderssons Minne for grants which made this investigation possible.

LITERATURE.

- 1) *Cotebrook, L., Buttle, G. A. H. and O'Meara, R. A. Q.*: The Mode of Action of p-aminobenzo-sulphonamide and Pron-tosil in Haemolytic Streptococcal Infections. *Lancet* II: 1323, 1936.
- 2) *Domagh, G. and Hegler, C.*: Chemotherapie bakterieller Infektio-nen. Leipzig 1940.
- 3) *Fleming, A.*: Antiseptics in Wartime Surgery. *Brit. M. J.* II: 715, 1940.
- 4) *Lockwood, J. S., Lynch, H. M.*: Studies on the Mechanism of the Action of Sulfanilamide. IV. The Influence of Pro-teolytic Products on the Effectiveness of Sulfanilamide. *J.A.M.A.* 114: 935, 1940.
- 5) *Long, P. H. and Haviland, J. W.*: The Problem of Pneumonia, with Reference to Chemotherapy and Serotherapy. *Ann. Int. Med.* 14: 1042, 1940.
- 6) *MacLean, J. H., Rogers, K. B. and Fleming A.*: M&B 693 and Pneumococci. *Lancet* I: 562, 1939.
- 7) *MacLeod, C. M.*: Chemotherapy of Pneumococcic Pneumonia. *J.A.M.A.* 113: 1405, 1939.
- 8) — and *Daddi, G. A.*: »Sulfapyridine — Fast« Strain of Penu-mococcus Type I. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 41: 69, 1939.
- 9) *Penfold, W. J.*: Action of Pneumococcus on Aromatic Amino-bodies *M. J. of Australia* 2: 120, 1922 (ref. *J. A. M. A.* 79: 1273, 1922).
- 10) *Schmidt, L. H., Clausus, C. E. and Starks, E.*: Response of Sul-fapyridinefast Pneumococci to Sulfathiazole and Sulfamethylthiazole. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 45: 256, 1940.
- 11) — *Sesler, L. C. and Green, M.*: The Sensitivity of Pneu-mococci to Sulfapyridine as Related to Production of Hydrogen Peroxide. *J. Bact.* 41: 82, 1941.
- 12) *Smith, K.*: Experimentelle chemoterapeutiske Studier. *Nord. Med.* 8: 2211, 1940.
- 13) — *Experimental Studies on the Effect of Sulfapyridine on the Pneumococci and Gonococci.* Köpenhamn 1941.
- 14) — and *Reymann, F. E.*: Experimentelle og Kliniske Under-søgelser over Gonococcers Følsomhed overfor Sulfapyridin. *Nord. Med.* 8: 2493, 1940.
- 15) *Stamp, T. C.*: Bacteriostatic Action of Sulfanilamid in vitro. *Lancet* II: 10, 1939.
- 16) *Whithby, L. E. H.*: Chemotherapy of Pneumococcal and other

Infections with 2-(p-Amino-Benzoesulfonamide)-Puridine.
Lancet I: 1210, 1938.

- 17) *Whithby, L. E. H.*: Chemotherapy of Bacterial Infections. Lancet II: 1095, 1938.
- 18) *Hagerman, G.*: En ny, enkel metod för kemoresistensbestämning in vitro. Nord. Med. 12: 3534, 1941.
- 19) *Möller, O.*: Further Experiences of the Frequency of the Different Types of Pneumococcus in South Sweden. Acta pathol. & microbiol. scand. In print.

A CASE OF LISTERELLA INFECTION IN LAMB.*)

By Aage Jepsen.

(Received for publication December 22nd, 1941).

In 1926 Murray, Webb & Swann published their studies on a hitherto unnoticed bacterial species, *Bact. monocytogenes*, as the cause of a septicemic infection in rabbits and guinea-pigs. Since then, the finding of similar bacteria in various other animal species has been reported not infrequently. In recent years the bacterium has been demonstrated also in infections in man.

The bacteria here concerned appear not to belong to any of the previously recognized groups of pathogenic bacteria, and they are generally taken to constitute a group by itself that is designated as *Listerella monocytogenes*. Under this name the bacterium is described in Bergey's »Manual of Determinative Bacteriology« 1939.

Besides in rabbits and guinea-pigs, spontaneous *Listerella* infections have been observed in South-African gerbilles (*Tatera lobengulae*) (Pirie, 1927), sheep (Gill, 1931), cattle (Jones & Little, 1934) and chicken (Seastone 1935). The *Listerella* infection appears to have been demonstrated most frequently in sheep as the cause of an enzootic or epizootic encephalomyelitis, which in English-speaking countries is known under the name »circling disease«. In cattle, too, *Lister-*

*) These studies were carried out with the aid of a grant from Viktor A. Goldschmidt's legacy.

ella has been demonstrated as the cause of encephalitis. In *Listerella* infection in rodents the most important finding has been multiple necroses of the liver, in some cases accompanied by encephalitic changes.

In man the occurrence of *Listerella* was demonstrated first by *Nyfeldt* (1929). Subsequently *Listerella* has been found several times in septicemic infections involving the central nervous system. In most of these cases the bacterium has been isolated from the blood and from the cerebrospinal fluid, but also necrosis of the liver has been observed just as in rodents (*Burn*, 1939). For further details reference may be made to a review by *Stuart Paterson* on *Listerella* infections in animals and man reported up to 1939.

Nyfeldt has pointed out that *Murray*, *Webb* & *Swann* have hardly been the first to observe the occurrence of *Listerella* infections. As early as 1911, *Hülphers*, a Swedish veterinary bacteriologist, published in *Svensk Veterinärtidsskrift* a paper in which he mentioned a similar infection in rabbits, from which he isolated a bacterial strain which in the description quite corresponds to *Listerella monocytogenes*. For that matter, hitherto the *Listerella* infections have attracted attention almost exclusively in America, in England and elsewhere in the British Empire — for instance in South Africa and Australia, while they have been noticed but little on the European continent. In Denmark, as mentioned, *Nyfeldt* and subsequently *Schmidt* & *Nyfeldt* have isolated *Listerella* from man in a number of cases, whereas infections with this microorganism appear not to have been demonstrated in animals.

In the following a case of *Listerella* infection in lamb will be reported. It was observed in the Hygienic-Bacteriological Laboratory of the Royal Veterinary and Agricultural College in January 1941. In the lambing season in 1941 the laboratory received a number of dead infantile lambs from various sheep herds — as a part in the systematic investigation concerning certain anaerobic infections, but the bacteriological examination included also cultures on blood agar

plates from the liver, spleen and mesenteric and pharyngeal lymph glands of the dead lamb.

On January 18, 1941 we received a dead lamb 10 days old. It came from a sheep herd in central Zealand, and the information was given that the lamb had been rather weak ever since birth, appearing to be ill. On autopsy the liver was found to be crowded with whitish necrotic nodules (up to the size of a hempseed) and the spleen was distinctly enlarged, but no changes were seen in the other organs. The central nervous system was not examined.

The changes in the liver were very striking, entirely different from previous findings in autopsies of lambs. Smears from the liver and spleen showed numerous Gram-positive bacilli varying in length. Blood agar cultures from the liver and spleen gave in 24 hours a dense growth of tiny clear colonies surrounded by a narrow hemolytic zone. The culture reminded somewhat of hemolytic streptococci, but the colonies consisted of the same Gram-positive rods as observed in smears from the organs. Obviously we here were dealing with a bacterial form we had not seen before. After the isolation, the obtained bacterial strains were studied more thoroughly.

Morphological Features. — Under the microscope the bacteria appeared as rods with rounded ends, measuring 1—2 μ in length and about 0.5 μ in thickness. In smears from the cultures the bacteria were on an average shorter and more uniform than in the smears from the organs, and often arranged in dense heaps (Fig. 1). In the older cultures some of the bacteria were longer and filiform. The bacteria were always markedly Gram-positive and stained readily with all ordinary bacterial stains. They were not acid-fast, and no spore formation was observed. In 24-hour cultures (at 37°) the bacteria were slightly motile or non-motile, but in 18-hour cultures, cultivated at 25°, they were lively motile (*Mc Gaughey*, cited after *Paterson*). Flagella were very difficult to demonstrate by staining. Still, in 18-hour cultures at 25°, in glucose broth or in surface colonies on 1 % glucose agar, it was possible by staining with basic fuchsin after *Leifson's*

method, as given by Paterson, to demonstrate a few bacteria equipped with several long peritrichous flagella.

Cultural Characteristics. — On ordinary weal-infusion peptone agar the bacteria grew rather poorly but addition of 5 % defibrinated blood or 1 % glucose promoted the growth considerably. The deep colonies were lentil-shaped. The sur-

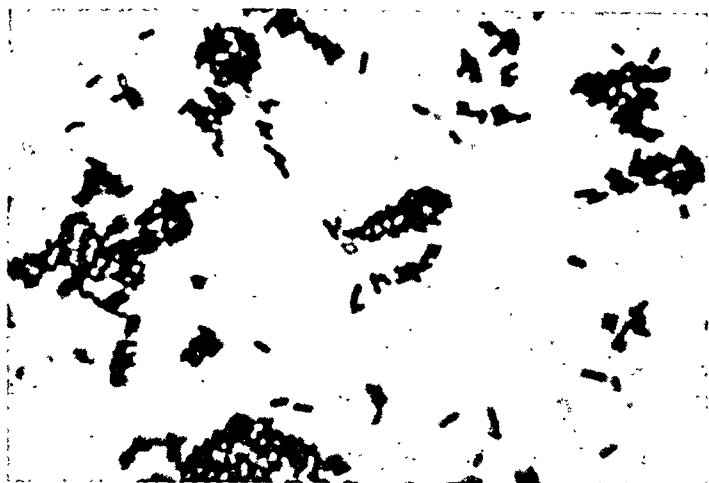


Fig. 4.

Listerella monocytogenes, strain Tersløse 18/1-41. Glucose agar culture. Gram-stain. Magnif. $\times 1800$. This and the following micro-photos were taken by the writer.

face colonies were shallow-cupolar, smooth and glistening, bluish translucent, milkwhite in direct illumination. As a rule the growth was distinct after 24 hours at 37° , but occasionally first in 48-hour cultures. Glucose agar cultures had a pronounced acid odor. On blood agar plates the colonies were surrounded by a very narrow hemolytic zone of the beta-hemolysis type which extended only slightly beyond the circumference of the colony. Protracted incubation did not increase the size of the colonies essentially. Well-isolated surface colonies did not exceed 3—4 mm. in diameter.

In 1 % glucose broth the 24-hour growth was usually vigorous, with formation of a rather firm sediment and diffuse opaqueness of the supernatant fluid. Agar and gelatine

Table 1.

Biochemical reactions.

Listerella St. Murray 1926 and St. Tersløse 18/1-41.

	St. Murray 1926	St. Tersløse 18/1 1941
Lithmus milk	(S)	(S)
H ₂ S	0	0
Nitrate reduction	0	0
Indol	0	0
Glucose	S	S
Galactose	0	0
Lactose	S	S
Saccharose	S	S
Maltose	S	S
Raffinose	0	0
Dextrin	S	S
Starch	S	S
Inulin	0	0
Arabinose	0	0
Xylose	0	0
Rhamnose	S	S
Inosit	0	0
Glycerine	S	S
Mannit	0	0
Sorbit	0	0
Dulcit	0	0
Salicin	S	S

stab cultures showed growth around the stab canal, without extension on the surface. The gelatine was not liquified, but in old gelatine stab cultures there appeared in the course of a month a good many irregular offshoots from the stab canal horizontally out into the column of culture medium.

On glucose agar slant the growth appeared as a very thin, delicate, bluish translucent membrane. The bacterium is a facultative anaerob. At room temperature the stab cultures survive readily for two months.

Biochemical Reactions. — On examination of the biochemical aspects our strain was found to behave like Murray's original rabbit strain from 1926.*)

The culture medium employed in the fermentation tests was 1 % peptone solution with 5 % serum, and bromothymol blue for indicator. The results of the tests are recorded in Table 1. The most rapid and strongest acid formation was found in glucose, maltose, rhamnose and salicin. With the other »sugars« it took 8—12 days before any fermentation appeared.

Pathogenic Aspects. — On inoculation the bacteria were found to possess a considerable virulence for rabbits, guinea-pigs and white mice. Rabbits inoculated intravenously with respectively 2, 0.5 and 0.2 cc. of a 24-hour glucose broth culture died in 2—3 days. On autopsy the spleen was found to be greatly enlarged, and the liver presented a great many typical areas of necrosis (Fig. 2). Guinea-pigs inoculated intraperitoneally or subcutaneously with 1 cc. of glucose broth culture died after 3—4 days. On autopsy they showed marked enlargement of the spleen and multiple necrotic areas in the liver. In addition, the guinea-pigs that had been inoculated intraperitoneally showed pronounced peritonitis of serofibrinous character. A corresponding picture was seen on intraperitoneal inoculation of mice.

Histological examination of the liver in the spontaneously

*) Kindly placed at our disposal by Dr. A. Nyfeldt.



Fig. 2.

Multiple necroses in the liver of a rabbit that died after intravenous inoculation with *Listerella*, strain Terslose 18/1-41.

infected lamb as well as in the inoculated rabbits showed multiple cellular infiltrations in the liver parenchyma consisting of mononuclear cells and polymorphonuclear leucocytes, together with central necrosis in the older nodules (Figs. 3 and 4).

Serological Tests. — Firstly, simple agglutination tests were made with strain Murray 1926 and strain Terslose 18/1-41 (our strain) and a number of *Listerella* sera which were generously placed at our disposal by Dr. Nyfeldt. Two of these sera were original sera from Cambridge, produced by Murray and Gibson; the others were produced by Nyfeldt with various *Listerella* strains.

Then cross agglutination tests were made, antiserum for strain Terslose being made by immunization of rabbits. An 18-hour glucose broth culture, grown at 25°, was employed as antigen and agglutinin. It proved surprisingly easy to produce sera with very high antibody titer: after only 5 injections at intervals of 4 days, the homologous strain was

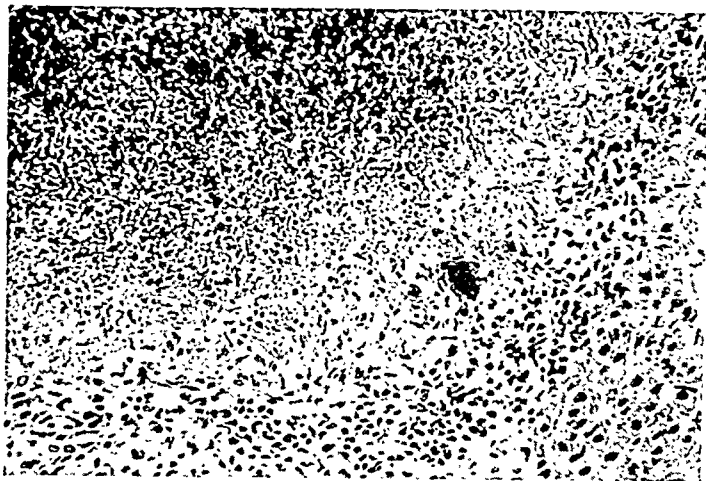


Fig. 3.

Cellular reaction in the liver of a lamb with spontaneous *Listerella* infection. Hemalun-eosin. Magnif. $\times 390$.

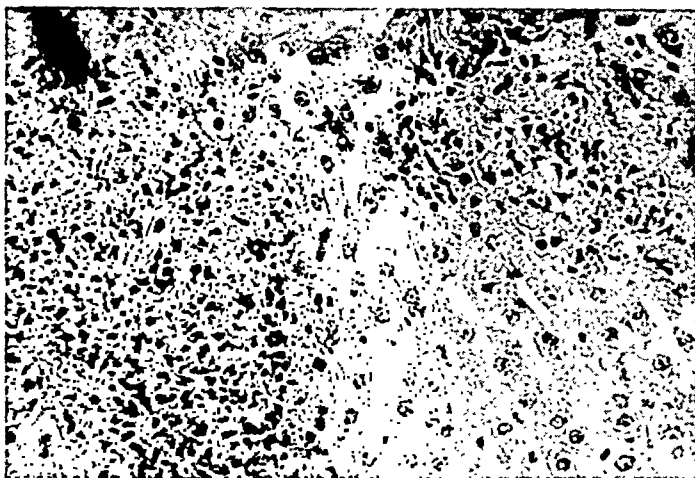


Fig. 4.

Cellular reaction in the liver of a rabbit inoculated intravenously with *Listerella*, strain Tersløse 18/1-41. Hemalun-eosin. Magnif. $\times 780$.

agglutinated totally by the serum in dilution 1:ca 80000. Table 2 gives a survey of the agglutination tests performed.

From Table 2 it is evident that the examined *Listerella*

Table 2.
Agglutination tests with
St. Murray 1926 and St. Tersløse 18/4-41.

Serum	Murray	SL/1		SL/2		SL/3		SL/4		SL/5		S/Ters- løse 18/4-41	
Strain	Tersløse 18/4-41	Tersløse 18/4-41	Murray 1926	Tersløse 18/4-41	Murray 1926	Tersløse 18/4-41	Murray 1926	Tersløse 18/4-41	Murray 1926	Tersløse 18/4-41	Murray 1926	Tersløse 18/4-41	Murray 1926
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
320	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
640	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1280	p	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2560	0	+	+	+	+	p	p	+	+	+	+	+	+
5120	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+
10240	0	+	+	+	+	0	0	+	p	+	+	+	+
20480	0	+	+	+	+	0	0	0	0	p	p	+	+
40960	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+	p
81920	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+	p
162880	0	0	0	+	p	0	0	0	0	0	0	p	0
333680	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

sera agglutinated strain Murray 1926 and strain Tersløse practically to the same titer limit. The agglutination appeared as a typical H-agglutination with aggregation of the bacteria in coarse flocules.

Already Murray and collaborators found a considerable increase in the monocyte content of the blood in *Listerella*-infected rabbits — an observation that has been confirmed by subsequent investigators. Also strain Tersløse was found to correspond to the description in this respect: 3 days after

inoculation of rabbits with sublethal doses of the bacteria, the monocyte content of the rabbit blood had increased almost to the quadruple of the initial value.

After the findings here presented there can hardly be any doubt that the isolated bacterial strain belongs to the *Listerella* group.

Subsequently the owner of the sheep herd gave us the information that the lamb we had received had been ill for 10 days with symptoms of a brain lesion. Unfortunately, as mentioned, on autopsy no examination was made of the central nervous system. No other instance of the affection appeared among the other lambs born in the same season. So it appears to have been a sporadic case of *Listerella* infection.

Summary.

On autopsy a lamb presented multiple necroses of the liver. From the necrotic processes in the liver and from the spleen a bacterial strain was isolated that on thorough examination proved to be identical with *Listerella monocytogenes*.

REFERENCES.

- Burn, C. G.*: J. Bact. 30, 1935, p. 572.
Gill, D. A.: Vet. J. 87, 1931, p. 60.
Hülphers, G.: Svensk Vet. Tidsskr., 16, 1911, p. 265.
Jones, F. S. & Little, R. B.: Arch. Path., 18, 1934, p. 580.
Leifson, E.: J. Bact. 1930, 20, p. 203.
Murray, E. G. D., Webb, R. A. & Swann, M. B. R.: J. Path. Bact. 29, 1926, p. 407.
Nyfeldt, A.: C. R. Soc. Biol. 101, 1929, p. 590.
Paterson, J. S.: Vet. Rec., 1939, p. 873.
 — J. Path. Bact. 48, 1939, p. 25.
Pirie, J. H. H.: Publ. S. Afric. Inst. Med. Res. 3, 1927, p. 163.
Schmidt, V. & Nyfeldt, A.: Ugeskr. f. Læger 100, 1938, p. 336.
Seastone, C. V.: J. exp. Med. 62, 1935, p. 203.

STUDIES ON THE EFFECT OF A PELLAGRA- PRODUCING DIET IN DOGS, WITH SPECIAL REFERENCE TO THE HISTOLOGICAL CHANGES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM.*)

By *Hans Jensenius* and *Flemming Norgaard*.

(Received for publication December 30th, 1941).

Introduction.

The studies carried out in the last decade by Petri and collaborators on the results of total gastrectomy and elective resections of the stomach and duodenum on dogs and swine were aimed originally at the pathogenesis of pernicious anemia. Subsequently, however, they led to the establishment of the concept »gastroprival pellagra«. On employment of very young animals (pups and pigs) instead of adult, total gastrectomy constantly resulted in a fatal symptom complex, the more important characteristics of which — arrest of growth, changes in the skin and central nervous system, besides anemia — made it justifiable to reckon it as belonging to the group of pellagrous lesions. Furthermore, therapeutic experiments with treatment of pellagra and polyneuritis in man with human gastric juice or with preparations of swine stomach and hydrochloric acid gave most favorable results also in patients who had been treated previously with large

*) These studies have been carried out with the aid of a grant from P. Carl Petersens Fond.

Translation from Danish by Hans Andersen, M.D.

doses of vitamins to no avail. On the basis of these findings the hypothesis was set forth that absence of a specific stomach function is the cause of pellagra.

Subsequently it has been possible further to corroborate this view by therapeutic experiments. For gastropyloric pellagra in young total-gastrectomized swine has proved completely refractory to parenteral administration of the injectable components of the vitamin B complex known at that time, including nicotinic acid, while in one case — after resection of the pylorus, which has caused gastropyloric pellagra but exceptionally — a very pronounced therapeutic effect was obtained with nicotinic acid, covering all the above-mentioned clinical symptoms. Naturally this effect had to be attributed to the presence of a very considerable rest of the stomach (fundus) in this case, in contrast to the aforementioned cases. Under these circumstances, then, the gastropyloric pellagra proved analogous to the other established pellagrous conditions with regard to its susceptibility to treatment with nicotinic acid.

In subsequent studies on the causation of the pellagra it seemed reasonable to assume that some important information might be obtained by comparison between gastropyloric pellagra and the pellagrous affections produced experimentally in animals by dietary insufficiency, possibly by combination of the two experimental methods — especially by comparison of the susceptibility to treatment with nicotinic acid. For this reason, experiments were made (by Jensenius) on the experimental production of black tongue in dogs, the experimental conditions which so far have been reckoned as coming nearest the human pellagra.

Previous Investigations.

Nearly all the investigations reported so far on black tongue and the effect of nicotinic acid on this lesion have come from U. S. A.: Goldberger *et al.*, Elvehjem *et al.*, Rhoads & Miller, Sebrell *et al.*, Margolis *et al.*, and Birch. Even as late as 1938 Brion stated that experimental black tongue had never been produced in Europe.

In recent years, however, Nicolaisen & Laland and Gerald have reported some experiments of this kind from Europe. But Fitz Gerald found the course of the lesion to deviate in several respects from the American observations: the tongue symptoms were inconstant and sometimes spontaneously remittent, while the therapeutic effect of the nicotinic acid was uncertain. The variations of the classical Goldberger diet employed by the various authors are evident from Table 1.

Table 1.

Composition of the Pellagra-producing Diet employed by Various Investigators.

(For the sake of comparison all the diets have been calculated for a total amount of 100 g.)

	Rhoads & Miller 1933	Koehn & Elve- hjem 1937	Harvey et al. 1938	Nicolai- sen & Laland 1938	Margo- lis et al. 1939	Birch 1939	Jense- nius & Nor- gaard
Yellow cornmeal		72	68.4		65	74	
White cornmeal	67.2			25.9			72
Black-eyed beans. ..	8.4	0	8.6	0	8	8	
Purified casein	10.1	18	10.3	15.5	10	9	18
Sugar	0	0	5.5	36.3	5	0	
Cottonseed oil	5.0	5	5.1		5	6	
Arachis oil				15.5			5
Salt mixture	6.7	3	2.1	4.1	2	2.5	3
Cod liver oil	2.7	2		2.6	5	1	2
Addition of vitamin B ₁	+			+		+	

Among the previous studies on black tongue in dog, only a few have included *histological examination of the central nervous system of the animal*, and the results of these examinations have been partially conflicting.

In acute black tongue, thus, Denton was unable to demonstrate any abnormality in the central nervous system; and Zimmerman & Burack found only medullary sheath degeneration in the peripheral nerves. On the other hand, Zimmerman, Cowgill, Bunnell & Dann demonstrated also medullary sheath changes in the spinal cord accompanied by glia reaction.

A more *chronic* form of black tongue has been produced, among others, by Gildea, Kattwinkel & Castle, Crane-Lillie & Rhoads, Gildea, Castle, Gildea & Cobb. On histological examination of the

central nervous system in these animals the authors found, besides minor changes in the peripheral nerves (Gildea, Kattwinkel & Castle) also medullary sheath degeneration as well as changes in the ganglion cells diffusely in the central nervous system, in part accompanied by glia reaction (Gildea, Castle, Gildea & Cobb).

Writers' Investigation.

Experiments were carried out on 2 dogs (Nos. 119 and 120), 3 months old. A composition of the experimental diet



Fig. 1.

Degeneration of medullary sheaths in the posterior tracts of the thoracic part of the spinal cord (dogs 119 and 120). Mahon's stain. Magnif. $\times 300$.

is given in Table 1. Every day the animals were given as much of this diet, freshly prepared, as they wanted. Soon, *i. e.*, within 1—2 weeks, the appetite was lowered and there was a constant loss of weight, bringing about a considerable degree of emaciation. Otherwise there were no conspicuous clinical symptoms in the first 10—12 weeks. Then, suddenly,

the general condition of the dogs was aggravated considerably (in dog 119 on the 72' day; in dog 120 on the 88' day) with complete anorexia, diarrhea and muscular weakness; and the animals died respectively on the 76' day (dog 119) and on the 94' day (dog 120). *There was no abnormality of the oral mucosa.* Dog 119 did not show gastric achylia till the day before death; the hydrochloric acid secretion was preserved until then in this animal, and until death in the



Fig. 2.

Normal medullary sheaths in the posterior tracts of the thoracic part of the spinal cord (control dog 1 a). Mahon's stain.

Magnif. $\times 300$.

other one (examined by alcohol test meal). In dog 120 a slight degree of anemia was observed at the terminal stage (hemoglobin 60 % on the 92' day as against an initial hemoglobin value of 69 %). Autopsy showed hemorrhagic enteritis (severe degree in dog 117, moderate in dog 120) besides hyperemic, not hyperplastic bone marrow.

After the appearance of the clinical aggravation, in the case of dog 120 a try was made with nicotinic acid therapy (50 mg. in 0.1 % solution by mouth on the 92' and 93' days) but without any effect, presumably because the lesion then had progressed too far.

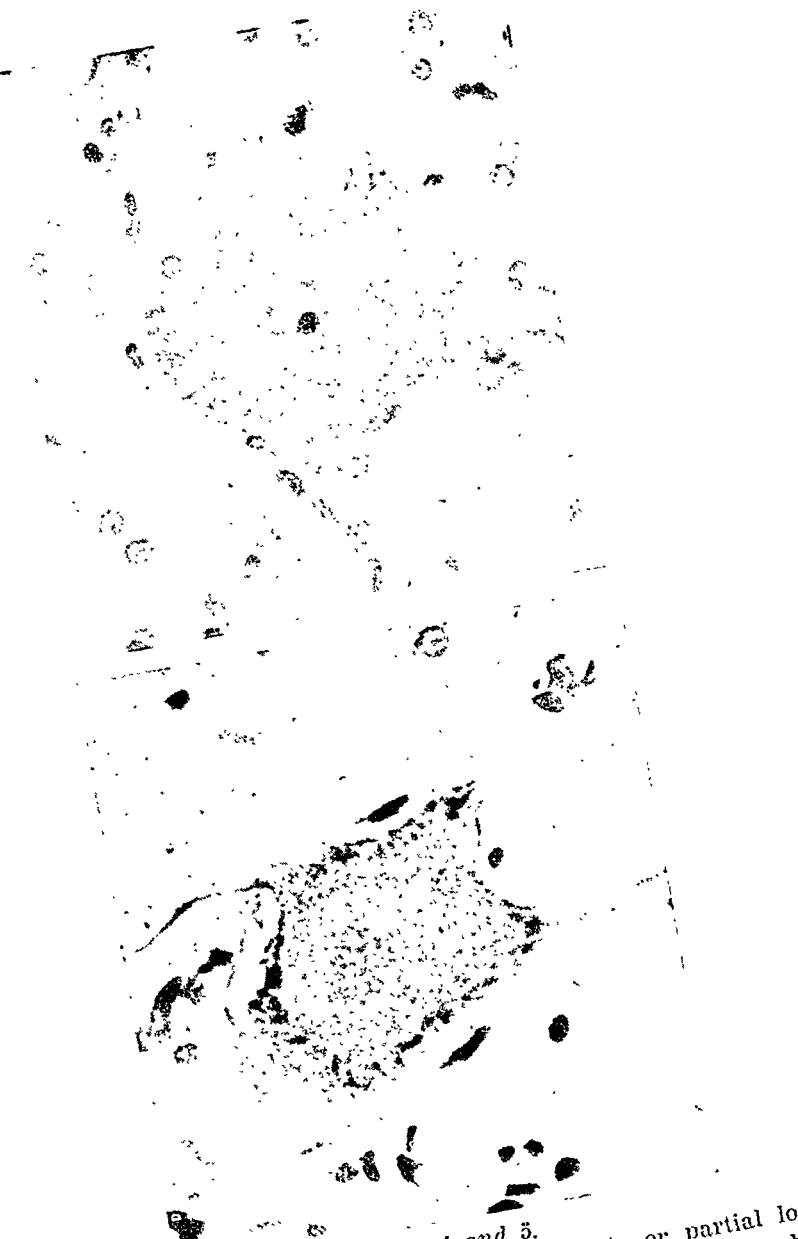


Fig. 3.

Sclerotic ganglion cell, medulla oblongata (dog 120). Einarson's stain. Magnif. $\times 600$.

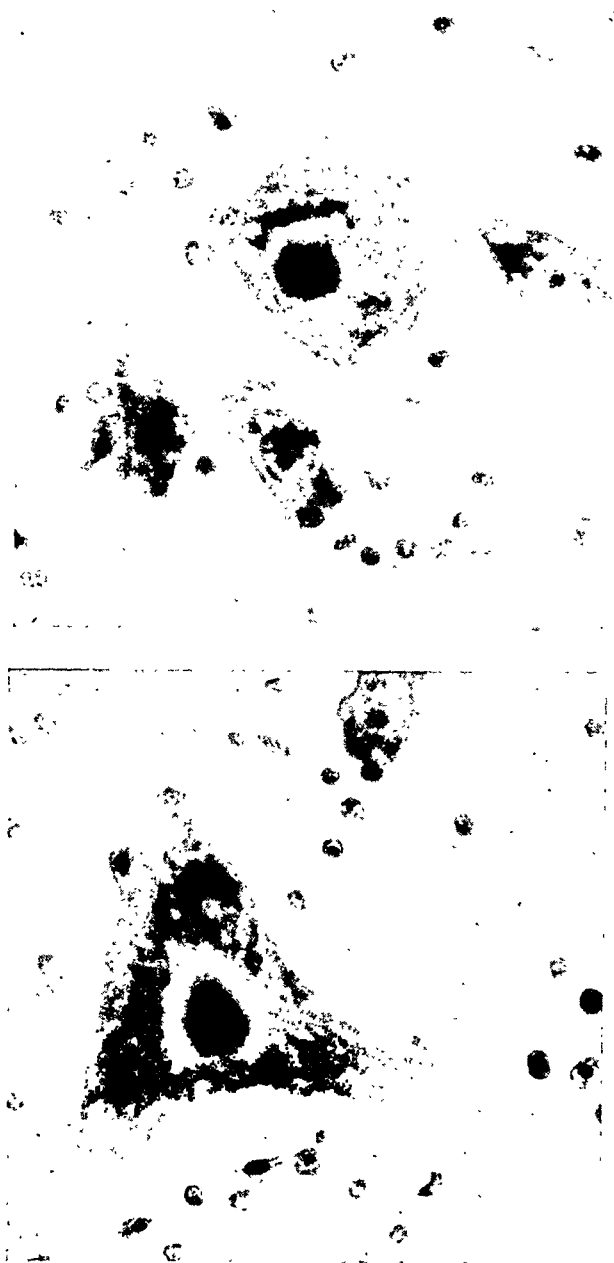
Histological Examination of the Central Nervous System (Nørgaard). Formalin fixation; embedding in paraffin; van Gieson-Hansen stain (for general survey); Mahon's stain (for medullary sheaths); and Einarson's gallocyanin chromallun method (for examination of ganglion cells). With the last-mentioned stain the glia nuclei can be studied very well.

Both dogs showed distinct though not very pronounced and somewhat scattered processes of medullary sheath degeneration in the spinal cord, increasing proximally, chiefly within the entrance zone of the posterior roots and the fasciculus cuneatus in the posterior tracts, besides in the lateral tracts, appearing as an irregular swelling or absence of medul-



The micrograph displays a section of a spinal cord, specifically the lumbar region. The tissue is stained with Einarson's stain. The most prominent feature is the swelling of the anterior horn cells, which appear as large, pale, and somewhat irregularly shaped structures. These cells contain small, dark granules (Nissl's granules) and have indistinct nuclear membranes. The surrounding tissue shows various other cellular components, including smaller, more densely stained cells and fibers. The overall appearance is one of cellular degeneration or pathology.

Figs. 4 and 5.
Swelling of anterior horn cells with complete or partial loss of
Nissl's granules, small vacuoles and indistinct nuclear membrane,
from the lumbar part of the spinal cord (dogs 120 and 119).
Einarson's stain. Magnif. $\times 600$.



Figs. 6 and 7.

Ganglion cells with changes resembling Nissl's »schwere Zellkrankheit«, anterior horn of the lumbar spinal cord and medulla oblongata (dog 120). Einarson's stain. Magnif. $\times 600$.

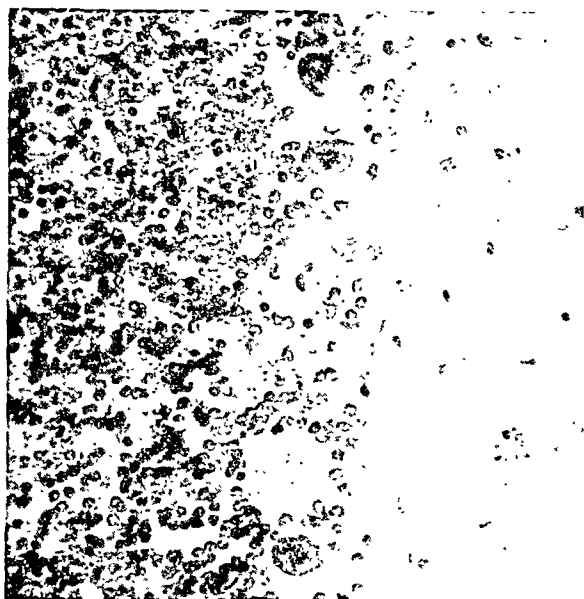


Fig. 8.

Markedly changed Purkinje cells, partly sclerotic, partly swollen (dog 120). Einarson's stain. Magnif. $\times 300$.

lary sheaths (Fig. 1). At the same time, the axis cylinders were often lost. Also degeneration of the posterior and anterior roots.

Further, both dogs showed extensive degenerative changes in the ganglion cells.

In dog 120 practically all the ganglion cells in the spinal cord were the site of changes of varying character and degree. A smaller part of them showed simple pathological shrinkage, in part a pronounced sclerosis (Fig. 3). Most of the ganglion cells, especially among the anterior horn cells, were swollen, often in a marked degree, with more or less complete loss of Nissl substance, and sometimes with vacuoles (Figs. 4 and 5). The nuclei were most often enlarged, light-staining, with effaced contours, but some of them were irregularly diminished, more deeply staining, here and there with enlarged nucleoli, so that the changes resembled Nissl's

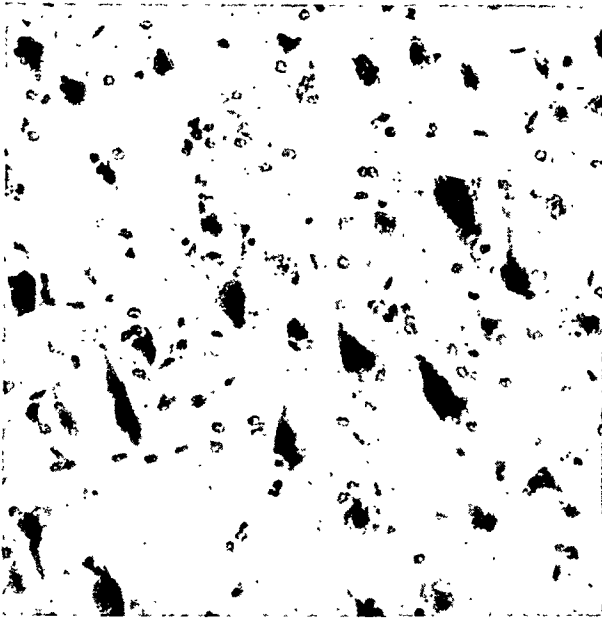


Fig. 9.

Sclerotic pyramidal cells in the motor zone (dog 120). Einarson's stain. Magnif. $\times 300$.

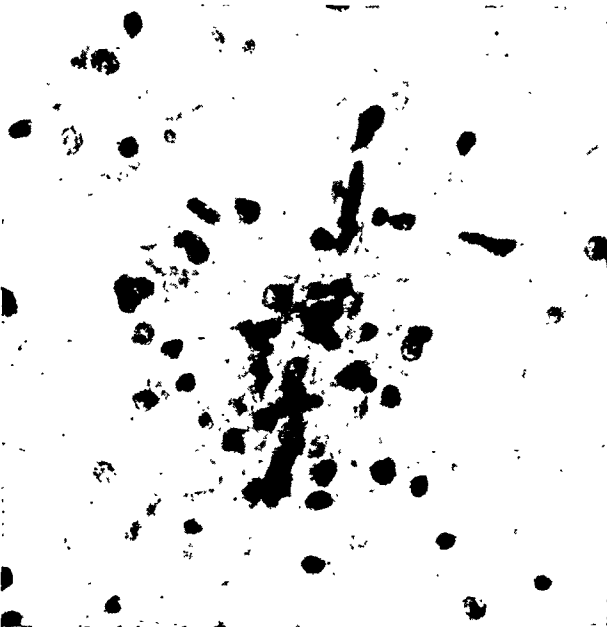


Fig. 10.

Microglia reaction (neuronophagia) in the pons (dog 120). Einarson's stain. Magnif $\times 600$.

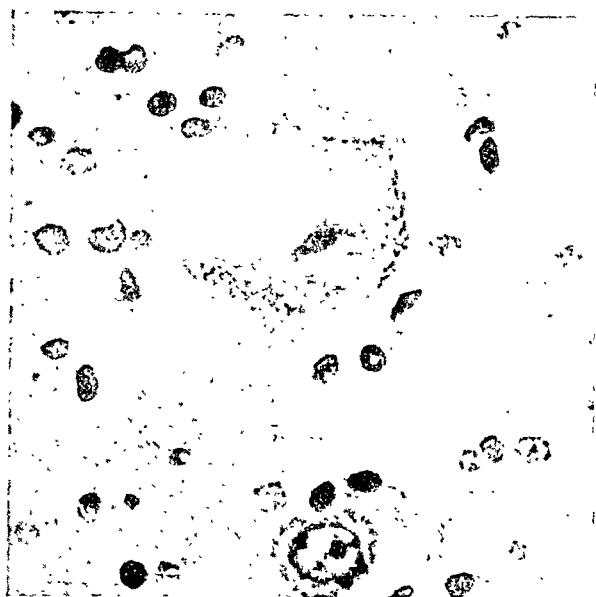


Fig. 11.

Ganglion cell with changes as in Nissl's »primäre Reizung«, from the brain stem at the level of the corpora quadrigemina (dog 119). Einarson's stain. Magnif. $\times 600$.

»schwere Zellkrankheit« (Figs. 6 and 7). Similar types of ganglion cell changes were observed in the spinal ganglia, medulla oblongata and pons, where especially the large ganglion cells were swollen, and also among the Purkinje cells (Fig. 8). Such changes were further seen in the brain stem, corresponding to the corpora quadrigemina, and in a lesser degree in the basal central ganglia in the brain. In the cortex cerebri, corresponding to the motor zone, there was a pronounced sclerosis of several ganglion cells, chiefly in the layer of the large pyramidal cells (Fig. 9). In connection with the ganglion cell changes there was a pronounced microglia reaction, especially in the medulla oblongata (Fig. 10), while the spinal cord showed an unquestionable increase in astroglia corresponding to the medullary sheath changes.

In dog 119 the ganglion cell changes were also very pro-

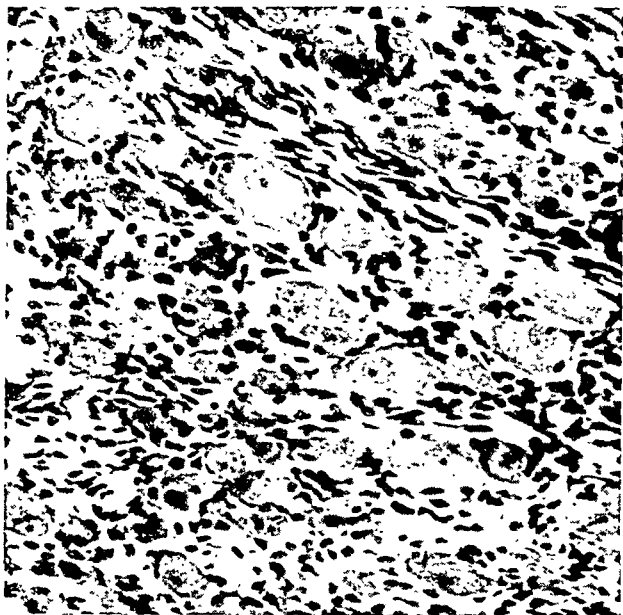


Fig. 12.

Degenerated sympathetic ganglion cells, partly swollen, partly shrunken, from the sympathetic trunk (dog 119). Einarson's stain. Magnif. $\times 300$.

nounced though not so marked as in the first-mentioned dog. Here typical instances of »primäre Reizung« (Fig. 11) were seen in the spinal cord as well as in the brain stem. Further, also this animal presented glia changes of the same character as seen in the other dog.

Neither animal showed any vascular changes — in particular, no hyalinization of the blood vessel walls, and no oedema of the tissue.

In one case (dog 119) the histological examination included also *sympathetic ganglia* from the sympathetic trunk. Numerous ganglion cells were moderately or markedly swollen with central or complete deterioration of the Nissl granules and eccentric nuclei, either lightly staining and enlarged (usually with a large nucleolus) or shrunken and deeply staining (Fig. 12).

Comparative Remarks.

As in Gerald's experiment, also in our animals did the clinical course of the affection deviate in one essential respect from the results obtained in the American experiments, as oral symptoms (ulceration and salivation) were absent in our animals.*) So it is disputable whether the acute, but rather late appearing, fatal vitamin B deficiency produced in these experiments is to be designated as black tongue.

The changes observed in the central nervous system in our dogs have been in agreement with findings in chronic black tongue as reported by Gildea, Kattwinkel & Castle, by Crane-Lillie & Rhoads, and by Gildea, Castle, Gildea & Cobb. When, in contrast to previous investigations of acute cases of black tongue, we have found such pronounced ganglion cell changes, it may be due perhaps in part to the technique employed, especially Einarson's gallocyenin-chromallun stain, with which all pathological cell changes appear very distinct and indisputable.

A comparison with the changes seen in the central nervous system in gastropyloric pellagra will be presented in a monograph on these changes to be published by one of us (Norgaard).

Summary.

An experiment with a pellagra-producing diet on young dogs resulted in a morbid condition resembling black tongue but lacking the characteristic oral symptoms of the latter.

The morphological changes produced in the central ner-

*) Partly because these characteristic symptoms, which generally are employed as criteria of the development and recovery of the affection, failed to appear in our dogs, and partly because it is practically impossible at present to procure the various components of the diet required, further experimentation along these lines had to be given up for the time being.

vous system in these dogs showed agreement with the changes demonstrated by other investigators in black tongue. In the present dogs, however, the changes in the ganglion cells were particularly pronounced.

Such changes were found also in sympathetic ganglia.

BIBLIOGRAPHY.

- Birch, Th. W.*: J. Nutr. 47, 281, 1939.
- Brion*: Presse med. 46, 933, 1938.
- Crane-Lillie, M. & C. P. Rhoads*: Arch. Pathol. 48, 459, 1934.
- Denton, J.*: Am. J. Pathol. 4, 341, 1928.
- Einarson, L.*: Am. J. Pathol. 8, 295, 1932.
- Elvehjem, C. A., R. J. Madden, F. M. Strong & D. W. Wolley*: J. Biol. Chem. 123, 137, 1938.
- Gerald, O. Fitz*: Zeitschr. f. Vitaminforsch. 9, 62, 1939.
- Gildea, M. C.-L., W. B. Castle, E. F. Gildea & S. Cobb*: Am. J. Pathol. 41, 669, 1935.
- Gildea, E. F., E. E. Kattwinkel & W. B. Castle*: New Engl. J. Med. 202, 523, 1930.
- Harvey, H. J., D. T. Smith, E. L. Persons & M. V. Burns*: J. Nutr. 46, 153, 1938.
- Koehn, C. J. & C. A. Elvehjem*: J. Biol. Chem. 148, 693, 1937.
- Margolis, L. H., G. Margolis & S. G. Smith*: J. Nutr. 47, 63, 1939.
- Miller, D. K. & C. P. Rhoads*: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 32, 419, 1934.
- Nicolaisen, R. & P. Laland*: Scand. Arch. Physiol. 79, 299, 1938.
- Norgaard, F.*: Hosp. Tid. 80, 1185, 1937.
- Comptes rendus de IIIe congrès neurologique internationale, Copenhague 1939, pag. 943.
- Norgaard, F. & E. Tobiassen*: Hosp. Tid. 84, 1041, 1938. — Acta med. scand. 97, 407, 1938.
- Petri, S., D. Boggild, A. Soeborg Ohlsen & F. Busch*: Hosp. Tid. 78, 573, 1935. — Acta path. et microbiol. scand. 42, 329, 1935.
- Petri, S., A. Soeborg Ohlsen & D. Boggild*: Hosp. Tid. 78, 629, 1935. Acta path. et microbiol. scand. 42, 460, 1935.
- Hosp. Tid. 78, 1153, 1935. Acta path. et microbiol. scand. Suppl. 26, 190, 1936.
- Petri, S., D. Boggild & A. Soeborg Ohlsen*: Hosp. Tid. 79, 509, 1936. Folia Haematologica 55, 161, 1936.

- Petri, S.*: Hosp. Tid. 79, 961, 1936. — Acta path. et microbiol. scand. 13, 350, 1936.
- Petri, S. & O. Wanscher*: Hosp. Tid. 79, 1003, 1936. Acta med. scand. 91, 370, 1937.
- Petri, S.*: Hosp. Tid. 80, 207, 1937. Acta path. et microbiol. scand. 14, 240, 1937.
- Petri, S., D. Boggild, A. Søeborg Ohlsen & O. Wanscher*: Hosp. Tid. 80, 185, 1937. Acta path. et microbiol. scand. 14, 111, 1937.
- Petri, S., O. Wanscher, E. & H. P. Stubbe Teglbjærg*: Hosp. Tid. 80, 817, 1937. Acta med. scand. 93, 450, 1937.
- Petri, S., F. Nørgaard & J. Bing*: Nord. med. Tidsskr. 14, 1303, 1937. Am. J. Med. Sci. 195, 717, 1938.
- Petri, S. & F. Nørgaard*: Transact. of the Seventh Scand. Pathol. Congress, Copenhagen 1938. — Acta path. et microbiol. scand. Suppl. 38, 159, 1938.
- Petri, S., F. Nørgaard & E. Bandier*: Acta med. scand. 98, 117, 1938.
— Acta med. scand. 103, 584, 1940.
— Acta med. scand. 104, 245, 1940.
- Petri, S. & H. Jensenius*: Acta med. scand. 106, 274, 1941.
- Petri, S., F. Nørgaard & H. Jensenius*: Acta med. scand. 107, 506, 1941.
- Rhoads, C. P. & D. K. Miller*: J. Exp. Med. 58, 585, 1933.
- Sebrell, W. H., R. H. Onstott, H. F. Fraser & F. S. Daft*: J. Nutr. 16, 355, 1938.
- Zimmerman, H. M. & E. Burack*: Arch. Path. 13, 207, 1932.
- Zimmerman, H. M., G. R. Cowgill, W. W. Bunnell & M. Dann*: Am. J. Physiol. 109, 440, 1934.

MULTIPLE NEUROFIBROMATOSE, EINE ERBLICHE KRANKHEIT MIT ÜBERGÄNGEN IN ANDERE GESCHWULSTFORMEN (GLIOMATOSE, SPINDELZELLENSARKOM, HÄMANGIOSARKOM).¹⁾

Von Professor, Dr. med. *Francis Harbitz*.

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. Januar 1942).

Im Jahre 1909 veröffentlichte ich eine Monographie über Neurofibrome und multiple Neurofibromatose (von Recklinghausensche Krankheit), in der ich u. a. 11 Fälle der letztgenannten Krankheit mitteilte.²⁾ In einer weiteren Arbeit konnte ich 1916 weitere 9 Fälle hinzufügen.³⁾ Unter den in der Monographie beschriebenen Fällen befand sich einer (Nr. 27), welcher eine Frau betraf, die mit 19 Jahren in die Augenklinik des Rikshospitals eingeliefert wurde wegen einer Geschwulst im linken Augenlid und in der linken Schläfe. Die Geschwulst war im Januar 1904 entfernt worden und erwies sich als ein typisches Beispiel plexiformer, rankenförmiger Neurome. Auf diesen Befund hin wurde die Kranke genauer

¹⁾ Ein Auszug dieser Arbeit bildete den Inhalt einer vom Verf. am 3. Dez. 1941 in »Det Norske Medicinske Selskap« gehaltenen Demonstration. Vgl. die Verhandlungen dieser Gesellschaft, *Nordisk Medicin*, (1942), Bd. 14, 1517, 1942.

²⁾ *Norsk Mag. Lægevid.* 70, 81—100; 194—237, 297—333 (1909) (Ein englischer Extrakt in *The Archives of internal Med.* Febr. 1909).

³⁾ *Norsk Mag. Lægevid.* 77, 8—18 (1916) (deutsch in »Ziegler's Beitr. allg. Pathol. u. pathol. Anat.« 62, 503 (1916)).

untersucht, wobei es sich herausstellte dass sie an von Recklinghausenscher Krankheit litt und zwar in ausgesprochenem Masse; teils wies sie zahlreiche Pigmentierungen der Haut auf, teils multiple Neurofibrome in einer Reihe von peripheren Nerven. Dies war einer der Fälle, welche mich veranlassten mich mit der multiplen Neurofibromatose zu beschäftigen. Die genannte Frau heiratete später und bekam insgesamt 9 Kinder. Unter diesen befand sich ein Junge (das 6. der Kinder), der im Alter von 9 Jahren starb und bei dem die Obduktion ergab, dass er an multipler Neurofibromatose in sämtlichen Nerven litt. Ausserdem lag eine Gliomatose oder »Neurinomatose« der cauda equina vor, die sich auch auf die Meningen erstreckte. Dieser Fall-vgl. im übrigen die Sippentafel. Generation III, Nr. 6 — wurde von mir 1932 in Norsk Magasin for Lægevidenskapen, sowie in Acta pathologica¹⁾ beschrieben. Bei der Beschreibung dieses Falles war mein Augenmerk gerichtet teils auf die erbliche Belastung, teils auf die Art der Geschwulstbildungen und die Übergänge in Gliomatose, teils schliesslich auf die diffuse Ausbreitung auf die Meningen.

In einer neuen Arbeit (Vortrag in Norsk Medicinsk Selskap im Dezember 1937) kam ich 1938 auf die gleichen Fälle zurück, indem ich diese Familie gesammelt beschrieb, in der in 3 Generationen mehr oder weniger ausgesprochene Fälle von Recklinghausenscher Krankheit nachgewiesen werden konnten: »En familie med multipel neurofibromatose«. Bei der Kontrolluntersuchung der erwähnten Frau M. K. (bei der die Krankheit 1904 entdeckt wurde) und ihrer Familie zeigte sich nämlich sowohl, dass die Krankheit bereits in einer früheren Generation — bei der Mutter — vorkam, als auch besonders, dass Frau M. K. die Krankheit auf ihre sämtlichen 9 Kinder übertragen hatte. Die Sippentafel wurde von mir eingehend für drei Generationen beschrieben.²⁾ Damit glaubte ich meine Beschäftigung mit dieser heimgesuchten Familie abschliessen zu können. Dem wurde indessen nicht so.

¹⁾ Norsk Mag. Lægevid. 93, 841 (1932) (deutsch in »Acta pathol. et microbiol. Scand.« 9, 359 (1932) — Fall I).

²⁾ Norsk Mag. Lægevid. 98, 609 (1938).

Im Jahre 1938 starb nämlich das viertälteste der 9 Kinder, eine Tochter im Alter von 23½ Jahren, von der es sich erwies, dass sie klinisch von der gleichen Krankheit befallen war wie ihre Mutter und ihre 8 Geschwister, was auch durch die Obduktion vollauf bestätigt wurde. Es zeigte sich nämlich, dass sie an schwerer und ausgebreiteter multipler Neurofibromatose litt. Daneben wurde gefunden, dass sich auf der Basis der Geschwülste im Nervensystem andere multiple Geschwülste entwickelt hatten, nämlich Hämangiosarkome — u. a. in Gestalt einer grossen intrathorazischen Geschwulst — und demzufolge meldete sich die Frage nach der Genese dieser Geschwülste und deren Zusammengehörigkeit überhaupt.

Dazu kommt noch hinzu, dass in den 4 Jahren, die seit meiner Veröffentlichung Anfang 1938 verstrichen sind, bei mehreren der anderen Familienglieder pathologische Zustände verschiedener Art auftraten, die verdienen in einem Bericht über die gesamte Familie berücksichtigt zu werden. Aus diesen Gründen sah ich mich veranlasst dieser merkwürdigen Familie eine gesammelte Darstellung zu widmen.

Zuerst die *Sippentafel dieser Familie mit multipler Neurofibromatose in 4 Generationen* (ausgehend von Frau M. K., die jetzt (1941) ca. 58 Jahre alt ist und die zweite Generation

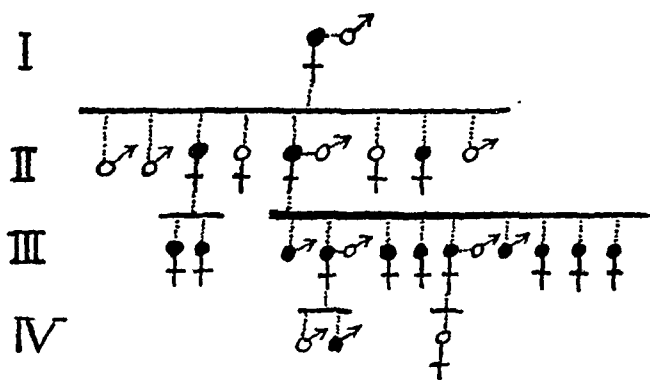


Fig. 1.
Sippentafel.

darstellt). Frau M. K. und ihre Familie ist von mir und meinen Assistenten viele Male im Laufe der Jahre untersucht worden letztmals von mir im September und November 1941.

Generation I.

Die Mutter von Frau M. K. hatte zahlreiche braune und rote Muttermaler und ausserdem pigmentfreie Mäler in der Haut. Sie starb im Alter von etwa 80 Jahren angeblich an Krebs.

Ihr Mann, d. h. der Vater, der M. K., hatte ein braunes Muttermal auf der rechten Wange. Er starb 65jährig. Sonstige Angaben über ihn fehlen.

Über die Grosseltern der M. K. ist weiter nichts bekannt. Die vielen Geschwister ihrer Mutter erreichten alle ein hohes Alter (sie starben im Alter von 80—90 Jahren). Die Sippe des Vaters ist angeblich gesund.

Generation II.

Frau M. K. (geb. 20. Jan. 1884, 58 Jahre alt) bildet den Ausgangspunkt für das Studium dieses Familienleidens und wurde von mir schon teilweise im Jahre 1908 beschrieben und später in meinen Arbeiten 1932 und besonders eingehend 1938. Patientin wurde von mir zum ersten Mal im Jahre 1904 untersucht als sie in der Augenklinik des Rikshospitals lag wegen einer Geschwulst im linken Augenlid und der linken Schläfe. Diese Geschwulst, die bei ihr mit Sicherheit im Alter von 1½ Jahren konstatiert worden war, erwies sich als aus plexiformen Neurofibromen bestehend. Da die Vermutung nahelag, dass Patientin an von Recklinghausenscher Krankheit, multipler Neurofibromatose, leiden konnte, wurde die Kranke von mir näher daraufhin untersucht, wobei es sich herausstellte, dass sie in der Haut zahlreiche braune und rote sowie pigmentfreie Mäler aufwies und ausserdem multiple Neurofibrome in vielen der peripheren Nerven.

Diese damals 19-20jährige Frau verheiratete sich später und gebar 9 Kinder. Die Pigmentmäler in der Haut hielten sich unverändert, dagegen trat Conjunktivitis und ein zweifelhaftes Rezidiv der Geschwülste im linken Augenlid auf; operation etwa 1931.

Januar 1931 wurde Patientin operiert wegen eines grossen Tumors im Pylorusteil des Magens. Gleichzeitig bestand Schwellung der benachbarten Lymphknoten. Die Geschwulst wurde operativ entfernt in der chirurgische Abteilung III des Ullevål Sykehus (Chefarzt Schilling). Die Geschwulst erwies sich mikroskopisch als

ein Adenokarzinom, der Tumor zeigte jedoch an einzelnen Stellen eine etwas eigentümliche Struktur (einem Hämangiosarkom ähnlich); ein Neurofibrom lag aber jedenfalls nicht vor. Patientin war später gesund und hatte eine gute Verdauung ohne Anzeichen eines Rezidivs des Magenkrebses. Dagegen hatte sie seit mehreren Jahren Ohrensausen, Kopfschmerzen und Schwindel- und Ohnmachtsanfälle, sowie ab und zu Erbrechen (Acusticus-Geschwülste?). Aus diesem Grunde ist sie so gut wie arbeitsunfähig und lebt von einer Witwenpension.

Bei der Kontrolluntersuchung im November 1941 wurde an der Stelle der unsprünglichen, entfernten Geschwulst an der Schläfe eine grosse, schlaffe, weiche Tasche vorgefunden und darüber eine tiefe Versenkung, anscheinend mit einem entsprechenden Defekt im Schädel. In der rechten Schläfe über dem rechten Ohr befindet sich ein grösser flacher, stark druckempfindlicher Knoten, ausserdem massenhaft druckempfindliche Knoten über den ganzen Körper zerstreut, insbesondere an beiden Seiten des Rumpfes und auf dem Rücken, ferner ein besonders druckempfindlicher Knoten über der rechten Hüfte, weniger zahlreiche, in Reihen angeordnete Knoten an den Armen, dagegen keine sicheren an den Beinen.

Frau M. K.'s *Mann*, der weder Pigmentmäler noch Neurofibrome aufwies wurde Sommer 1937 wegen eines Carcinoma coli operiert und starb im Dezember 1937 an einem Rezidiv.

Geschwister der M. K.

Frau M. K. hat 3 *Brüder*, jetzt 42 bis 69 Jahre alt. Keiner von diesen hat Muttermäler oder Geschwülste in der Haut oder an anderen Stellen des Körpers.

Eine *Schwester*, Frau M. E. F., 48 Jahre alt, dagegen hat grosse braune Mäler und leidet daneben an schlechter Verdauung, Kopfschmerzen und Schwindel.

Eine zweite *Schwester*, die 57 Jahre alt ist, hat ebenfalls braune Muttermäler, aber keine Geschwülste Ihre beiden *Töchter*, jetzt 38 bzw. 34 Jahre alt, haben gleichfalls braune Mäler, sind aber sonst gesund.

Schliesslich hat Frau M. K. eine unverheiratete *Schwester*, etwa 56 Jahre alt, die an Adipositas leidet und wegen einer grossen Geschwulst im Unterleib operiert wurde, aber keine Pigmentmäler oder Geschwülste der Nerven aufweist.

Generation III, Kinder der M. K.

1. *Sohn A. E.*, geb. 24. Dez. 1907, 34 Jahre alt, ledig, Schweizer. Zahlreiche Pigmentmäler auf der Haut sowie ziemlich grosse Gefässmäler. Die Muttermäler sitzen besonders an den Armen und im

Gesicht, ausserdem hat er multiple Neurofibrome am Oberarm. Sonst ist er frisch und gesund.

2. Tochter H., geb. 31. Dez. 1909, 32 Jahre alt. Hat zahlreiche Pigmentmäler und ein ähnliches grosses Mal, ausserdem einen Naevus vasculosus an der rechten Seite des Rumpfes, ferner eine längliche, druckempfindliche Geschwulst am Oberarm und ein elephantiasisähnliches Beet an der linken Hand. Diese Tochter ist verheiratet und hat *zwei Kinder*, einen gesunden *Jungen von 11 Jahren* (er hat jedoch rote Muttermäler) und einen *Jungen von 3 Jahren*, der in der behaarten Kopfhaut (im Nacken) einen erbsengrossen, druckempfindlichen harten Knoten aufweist, vermutlich ein Neurofibrom. Ausserdem hatte das Kind einen kleinen Knoten im linken Augenlid; dieser ist nun fast vollständig verschwunden. Keine Pigmentmäler. Dieses Kind repräsentiert somit die 4. Generation mit derselben Krankheit.

3. Tochter J., geb. 27. Sept. 1912, 29 Jahre alt, ledig. Hat Pigmentmäler verschiedener Grösse (erbsen- bis handtellergröss) über den ganzen Rumpf und die Extremitäten verteilt. Ausserdem linsen- bis erbsengrosse blaurote Mäler und einige Verrucae, ferner am Rumpf einige weiche Geschwülste, die einzelne derbere Körnchen enthalten. Grössere und kleinere Knoten, von normaler oder pigmentierter Haut bedeckt, an Rumpf und Extremitäten. In der linken Lendengegend eine taubeneigrosse, derbe, elastische Geschwulst, die in allen Richtungen leicht verschieblich ist, und unter dieser ein reiskorngrosser harter Knoten — beide hochgradig druckempfindlich. Unter der Haut des Abdomens finden sich mehrere ähnliche Knoten. Am rechten Oberschenkel eine pflaumengrosse unregelmässige, leichtbewegliche Geschwulst, ebenso an der Vorderseite des linken Oberarms eine pflaumengrosse ziemlich harte Geschwulst. In der linken Hohlhand ein nussgrosser Knoten, ausserdem mehrere erbsen- bis weizenkorn-grosse Knoten an der Dorsalseite beider Arme entlang. An der Ulnarseite des rechten Handgelenks eine pflaumengrosse weiche, kissenartige Verdickung in und unter der Haut. Schliesslich hat diese Tochter mehrere erbsen- bis weizenkorn-grosse Geschwülste auf der Stirn und im Haarboden.

Am 15. Aug. 1940 wurde in der linken Lumbalregion eine walnuss-grosse Geschwulst entfernt, die gut begrenzt war und mit einem Nervenast zusammenhing. Bei der mikroskopischen Untersuchung erwies sie sich als aus einem zellreichen fibrösen Gewebe aufgebaut, d. h. es handelte sich um ein Neurofibrom oder »Neurinom«, indem die Zellen an einzelnen Stellen palissadenförmige Anordnung zeigten, nirgends aber Wirbel bildeten. Der letztgenannte Knoten hatte etwa $\frac{1}{2}$ Jahr lang Schmerzen verursacht. Patientin ist auch

sonst recht schwächlich. Im September 1941 wurde sie zum Arbeitsdienst einberufen, von mir aber als arbeitsunfähig erklärt.

4. *Tochter E.*, geb. 8. Febr. 1915, gest. 6. Sept. 1938 im Alter von 23½ Jahren. Sie litt an ausgesprochener Neurofibromatose und starb auch an dieser Krankheit, indem sich eine grosse Geschwulst in der Brust entwickelte und ausserdem andere Geschwülste mit Metastasen. Auf diesen Fall wird in einem späteren Abschnitt getrennt eingegangen werden.

5. *Tochter A. K.*, geb. 1. Febr. 1918, ist also nu 23 Jahre alt. Soviel sie sich erinnern kann hat sie ihr ganzen Leben lang empfindliche Beulen am Rumpf gehabt, ausserdem zahlreiche grössere und kleinere Pigmentmäler, erbsen bis fünföregross, insbesondere auf dem Rumpf, dagegen keine roten Mäler (Angiome). In der linken Ellenbeuge hat sie einen grossen Tumor und hin und wieder durch diesen bedingte Schmerzen im linken Arm. Sie ist verheiratet und hat eine *Tochter von jetzt 3 Jahren*. Dieses Kind weist vorläufig weder Mäler noch Knoten auf, hat aber eine Hasenscharte in der Oberlippe links (von mir kontrolliert im November 1941). März 1941 ein Abort ohne Komplikationen.

Im Januar 1941 fing Patientin an Stiche in der rechten Seite der Brust, in der rechten Schulter und längs der rechten Brusthälfte zu bekommen, die bis in den Rücken reichten. Diese haben dauernd an Stärke zugenommen. Da sie ausserdem sich müde, schlapp und kraftlos fühlte und abmagerte, fürchtete sie dass etwas mit den Lungen nicht in Ordnung sei und wandte sich an die Tuberkuloseabteilung des Gesundheitsamts um ihre Lungen untersuchen zu lassen (Dr. Eyvind Dahl). Die Pirquetsche Reaktion war negativ. Bei der Röntgenuntersuchung wurde in der rechten Brusthöhle ein gut begrenzter, krachmandelgrosser Geschwulstknoten festgestellt. Am 4. Aug. 1941 wurde sie zwecks näherer Untersuchung in die IX. Abteilung des Ullevål Sykehus (Chefarzt Dr. med. Scheel) eingeliefert. Hier wurde festgestellt, dass sie an vielen Stellen des Körpers druckempfindliche Knoten aufwies, insbesondere den Halsmuskeln entlang auf beiden Seiten, in der Fossa supraclavicularis, besonders links, in beiden Ellenbeugen, in der rechten Leiste, sowie an der rechten Seite des Abdomens. Ausserdem hatte sie Pigmentmäler an verschiedenen Stellen am Rumpfes und an den Extremitäten.

Am Hals wurde ein Knoten exzidiert. Histologisch erwies sich dieser als aus einem zellarmen fibrösen Gewebe bestehend. Ferner wurde eine erneute Röntgenuntersuchung der Brust vorgenommen, wobei ein wandständiger intrathorakaler Tumor auf der rechten Seite gefunden wurde. Patientin wurde daher zwecks eventueller Operation in die III Abteilung (Chefarzt Dr. med. Semb) überführt.

Das Röntgenbild zeigte einen Tumor, der hinten auf die 4. rechte Rippe und in den 3.—4. Intercostalraum projiziert wurde in Gestalt einer walnussgrossen homogenen Verschattung, die nicht mit der Lunge in Verbindung stand. Man nahm an, dass eine extrapleurale.

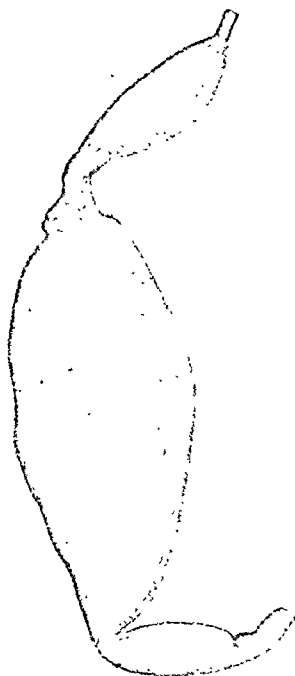


Fig. 2.
Neuro-fibrom am intercostalnerven, operativt entfernt,
ca. 5 cm. lang, über 2 cm. dick.

von einem Nerven ausgehende Geschwulst, ein Neurofibrom vorlag. und man entschied sich die Geschwulst zu exstirpieren. Die Operation wurde am 28. S. 41. von Chefarzt Semb vorgenommen nach genauer Lokalisierung der Geschwulst und Exstirpation der 6. und 7. Rippe. Der Tumor hing mit dem 6. Intercostalnerven zusammen. Dieser wurde nach beiden Seiten hin freigelegt, wobei auf beiden Seiten Verdickungen des Nerven aufgefunden wurden. Der Tumor wurde in seiner Gesamtheit mitsamt beiden Verlängerungen entfernt. Er war spindelförmig und von der Gröss eines kleinen Hühne-

reies. Der Intercostalnerf verlief mitten durch die Geschwulst in deren Längsachse. Unkomplizierter postoperativer Verlauf; Patientin wurde geheilt entlassen.

Der *ausgeschnittene Tumor* ist spindelförmig, etwa 5—6 cm lang und in der Mitte etwa 2,5 cm dick. Er spitzt sich nach beiden Seiten gleichmässig zu und geht hier in den Nerven über, der auf jeder Seite je eine kleinere spindelförmige Auftreibung zeigt (vgl. die schematische Zeichnung, fig. 2).

Mikroskopisch erweist sich die Geschwulst als aus einem zellarmen, fibrillären, oder beinahe myxomatösen Gewebe bestehend. An der Peripherie findet man Nervenfasern die unmittelbar in das Geschwulstgewebe übergehen ohne dass sich hätte entscheiden lassen ob das Geschwulstgewebe aus dem Peri- oder Endoneurium oder aus den Schwannschen Scheiden hervorgegangen war. Die Fasern waren zu einander in allen Richtungen kreuzenden Bündeln geordnet, und an einzelnen Stellen lagen die Kerne parallel nebeneinander (mit Andeutungen von Wirbelbildungen).

6. Sohn T., geb. 11. Dez. 1920, gest. im Rikshospital am 25. Dez. 1929, im Alter von 9 Jahren nachdem er mehr als 4 Jahre im Rikshospital zugebracht hatte. Dieser Fall wurde von mir 1932 beschrieben (Norsk Mag. f. Lægevid. 1932, S. 841, sowie Acta pathol. et microbiol. scandin. 9, 359 (1932) Fall I, zusammen mit anderen Fällen). Dieses Kind hatte Neurofibromatose in sämtlichen Nerven, welche diffus, zumal in den Extremitäten, aber auch sonst ausgebreitet war. Daneben wies er eine *Gliomatose* oder »*Neurinomatose*« der Cauda equina und des Plexus lumbosacralis auf; ausserdem war diese in den Meningen um die Medulla spinalis et oblongata, den Pons Varoli und das Cerebellum herum und schliesslich an der Innenseite der Hirnhöhlen nachweisbar mit Hydrocephalus internus. Für die Entwicklung von Hämangiomen in den Nervenknöten lagen keine Anhaltspunkte vor.

7. Tochter L., geb. 5. Mai 1923, ledig, Schreibfräulein. Hat 8—10 kleine braune Pigmentmäler am Hals, Rumpf und Armen, ist aber sonst gesund. Sie hat keine sicheren Geschwülste am Rumpf und an den Extremitäten.

8. Tochter M., geb. 19. März 1925, 16 Jahre alt. Hat ziemlich zahlreiche, ziemlich grosse braune Pigmentmäler an Hals, Rumpf und Armen, sowie ein sehr grosses Mal (Durchmesser 15 cm) auf der linken Seite des Rückens. Die Mäler sind angeboren. Sonst weist sie keine Geschwulstknoten auf und ist frisch und gesund.

9. Tochter E., geb. 21. Sept. 1927, 14 Jahre alt. Hat wie Nr. 8 etwa 15 angeborene, hanfkorngrosse braune Pigmentmäler, aber keine Nervengeschwülste und ist im übrigen frisch und gesund.

Beschreibung eines neuen, nunmehr eingehender untersuchten Falles — Sippentafel Generation III, Nr. 4.

Ellen K. (das viertälteste der 9 an von Recklinghausenscher Krankheit leidenden Kinder der M. K.) wurde am 8. Febr. 1915 geboren und starb am 6. Sept. 1938 im Alter von etwa 23½ Jahren an *multipler Neurofibromatose*, die Übergänge zeigte in atypische Geschwulstbildungen, am ehesten wohl ein *Hämangiosarkom*.

Teils durch Untersuchung ihrer selbst zu verschiedenen Zeiten, teils durch vom Ullevål Sykehus, wo sie im ganzen fünfmal eingeliefert wurde, erteilte Auskünfte wurde über ihren Gesundheitszustand folgendes ermittelt: Patientin hatte ihr Leben lang Pigmentmaler von stark wechselnder Grösse in der Haut. Ausserdem traten frühzeitig unter der Haut an verschiedenen Stellen zerstreut kleine Knötchen auf, so besonders allen Intercostalnerven entlang, zumal hinten nahe an der Wirbelsäule, ausserdem zahlreiche Knötchen am Halse, und endlich Knoten in der linken Schläfengegend (wie bei ihrer Mutter). Die Knötchen verursachten erhebliche Schmerzen, besonders die, welche unter der Haut der Oberextremitäten lagen, insbesondere in der rechten Ellenbeuge. Teils aus diesem Grunde, teils zur Sicherung der Diagnose wurden zu verschiedenen Zeiten Geschwulstknötchen entfernt (so im Radiumhospital 1934 und zu wiederholten Malen im Ullevål Sykehus); die mikroskopische Untersuchung ergab jeweils, dass sie die Struktur eines Neurofibroms besaßen.

In den letzten Jahren ihres Lebens bot Patientin verschiedene cerebrale Symptome dar, wie Kopfschmerzen, Schwindel, leichte Ohnmachtsanfälle, Ataxie, unsicheren Gang, sowie einen positiven Romberg. Der Albumingehalt des Liquor war erhöht. Ausserdem hatte sie starke Schmerzen besonders in der Lumbalregion und um die Taille. Ab September 1937 bekam sie auch Schmerzen in der linken Schulter, die in den Hals und Hinterkopf ausstrahlten, sowie in beiden Armen, wo sie zahlreiche Knötchen hatte. Trotz dieser Beschwerden und Krankheitssymptome hatte sie während der letzten Jahre

einen Hausposten bis wenige Monate vor ihrem Tode. Während 'des letzten halben Jahres bevor sie starb entwickelte sie übrigens eine zunehmende Dyspnoe.

Während ihres letzten Aufenthalts im Ullevål Sykehus vom 18. Juli bis zum 6. September 1938 wurde bei ihr eine extrapulmonale Geschwulst in der linken Pleurahöhle gefunden (Röntgenuntersuchung), welche die linke Lunge komprimierte und die Luftröhre nach rechts hinüberschob. Der Tumor wurde als inoperabel angesehen. Am 19. August wurde eine Thorakozentese vorgenommen und 900 ccm. seröse Flüssigkeit entleert. Sie starb am 6. September 1938.

Die *Obduktion* wurde am 7. Sept. 1938 von Dr. Ulland vorgenommen im pathologisch-anatomischen Institut des Ullevål Sykehus, und ich hatte Gelegenheit bei der Obduktion zugegen zu sein. Prosektor Hval stellte mir später in liebenswürdiger Weise seine Abschrift des Obduktionsprotokols zur Verfügung und gestattete mir die aufbewahrten Geschwülste und Organe zu untersuchen und stellte den ganzen Fall zu meiner Verfügung.

Bei der Obduktion wurde im Wesentlichen folgendes konstatiert:

Auf Rumpf und Extremitäten verstreut fanden sich zahlreiche Pigmentmäler, besonders zahlreich auf dem Rumpf, wo sie etwa weizenkorngross waren und dicht beieinander standen. An einzelnen Stellen fanden sich grössere pigmentierte Mäler — bis zu handtellergross — von schmutzig graubräunlicher Farbe, so an der Vorderseite des linken Oberschenkels ein 9×4 cm grosses Mal und an der linken Seite des Unterleibes ein $2\frac{1}{2} \times 1$ cm grosses.

Überall fand man unter der Haut weizenkorn- bis erbsengrosse harte, grauweisse Knoten. In beiden Fossae supraclaviculares fanden sich grössere Konglomerate aus dergleichen beweglichen Knoten von elastischer, derber Konsistenz, ebenso längs den Gefässenscheiden am Hals aufwärts, wo sie wie Perlen in einer Perlenkette den Musculi sterno-cleido-mastoidei entlang sassen. An den Seiten der Brust und des Unterleibs waren ähnliche Knoten zu sehen. In der linken

Schläfenregion sass ein weizenkorngrosser Knoten, ausserdem auf der Stirn dicht an der Haargrenze ein erbsengrosser Knoten. An der Medianseite wurden an beiden Armen den Nervengefässstämmen entlang grössere, bis zu taubeneigrosse Knoten angetroffen.

Als die Halsorgane herausgenommen wurden zeigte es sich, dass die Nerven in bis zu fingerdicke, unregelmässige Stränge verwandelt waren mit zahlreichen unregelmässigen Verdickungen und Einschnürungen; ihre Konsistenz war elastisch, die Schnittfläche grauweiss, etwas ödematös. Die Stränge gingen nach unten hin in grosse Konglomerate aus ähnlichen Knoten in den Fossae supraclaviculares über. Einzelne dieser Knoten hatten die Grösse eines kleinen Hühner-eies. Die Stränge setzten sich weiterhin auf beiden Seiten nach unten in das Mediastinum und bis in den retroperitonealen Raum hinein fort und ausserdem nach oben und hinten in den Nacken.

In der linken *Brusthöhle* wurde eine *mächtige Geschwulst* angetroffen, die 1920 g wog. Die Oberfläche derselben war grobhöckerig die Konsistenz ausgesprochen elastisch. Die Geschwulst war von einer derben, glänzenden Kapsel umgeben und teilweise durch fibröse Adhäsionen mit der Brustwand verklebt (Fig. 3). Die linke Lunge war nach hinten und unten zusammengedrückt und fast atelektatisch; sie liess sich jedoch leicht vom Tumor trennen und war nicht von Geschwulstmassen infiltriert. An ihrem oberen Pol ging die Geschwulst in einen daumendicken Strang über, der längs der Gefässscheide nach aufwärts zog. Die Schnittfläche der Geschwulst war graugelb mit zahlreichen einander kreuzenden Zügen; daneben waren auch gelbliche Flecken zu sehen sowie eine durch Zerfall entstandene) eigrosse Höhle. Hier und dort rote oder blaurote Fleckchen in der Geschwulstmasse. Unten gegen das Zwerchfell fand man einen gut begrenzten Hohlraum, der einen Liter dünne, hämorrhagische Flüssigkeit enthielt. Dem Zwerchfell sassen einige erbsen- bis paranuss-grosse, morsche Geschwulstmassen auf von grauroter Farbe und mit zahlreichen hämorrhagischen Partien. An keiner Stelle war ein

*Verdickte Nervenstämme
im Mediastinum*

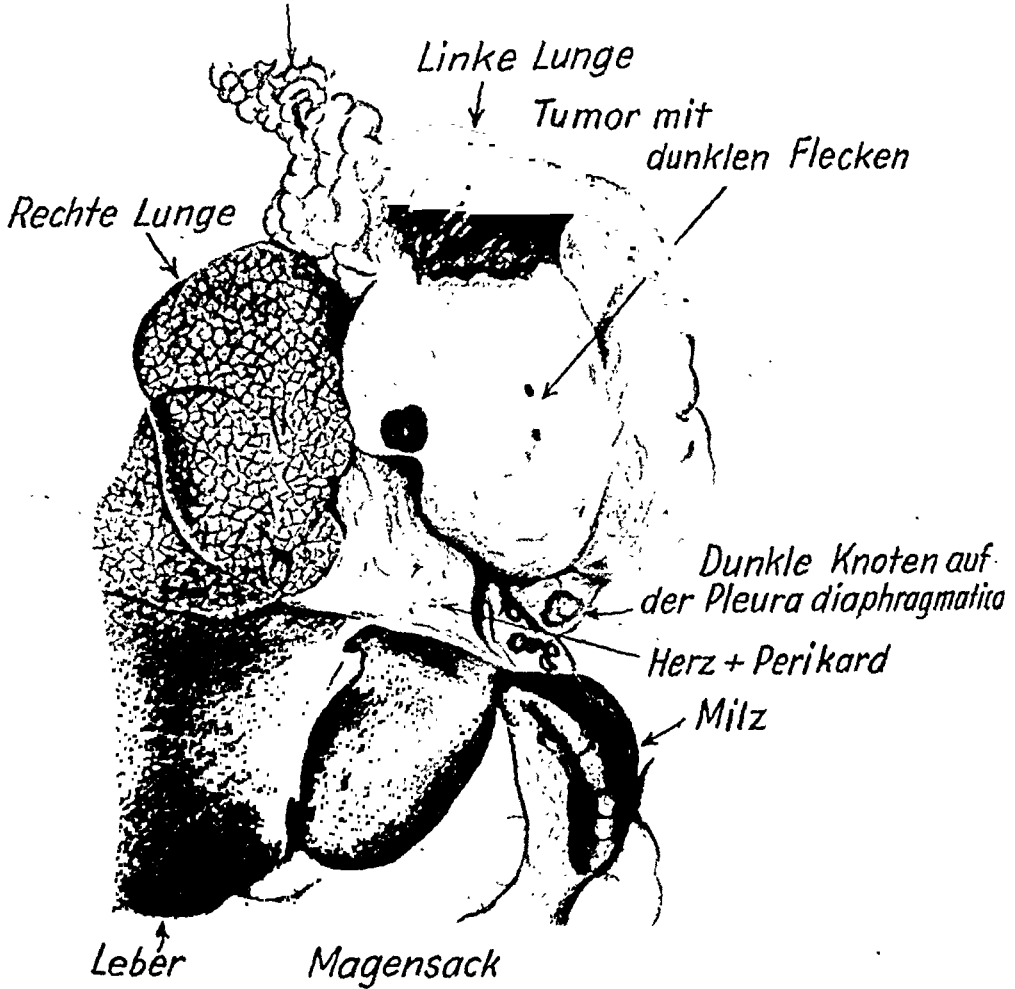


Fig. 3.

sicherer Durchbruch des Tumors durch die Kapsel nachweisbar.

In der rechten Lunge war ein bronchopneumonischer Herd vorhanden.

Im Mediastinum fanden sich auf beiden Seiten in der Längsrichtung verlaufende unregelmässige Stränge mit bis zu paranussgrossen Verdickungen. Je ein solcher Strang wurde gefunden entsprechend dem Nervus phrenicus, sowie den Nervi vagi und den Grenzsträngen des Sympathicus. Sämtliche Intercostalnerven waren angeschwollen, griffeldick oder dicker, aber nicht gleichmässig. Diese verdickten Nerven setzten sich bis an die Mittellinie fort und waren auch unter dem Peritoneum parietale zu sehen.

Herz, Aorta, Milz, Leber, Pankreas, Ventrikel, Duodenum und der übrige Darm und die Genitalien waren o. B.

Im Mesenterium des Dünn- und Dickdarms sah man ein eigentümliches Bild, nämlich gewundene und geschlängelte Stränge mit weizenkorn- bis walnussgrossen Knoten. Diese strahlten von der Gekrösewurzel gegen die Peripherie hin aus. Am ausgeprägtesten war dies im Mesocolon sigmoideum, wo die Stränge am grössten und am zahlreichsten waren. Ebenso wurden im Lig. hepatoduodenale ähnliche Stränge, ein reines »Schlangenknauel« bildend, gefunden; diese kommunizierten mit einem Konglomerat retroperitoneal gelegener, bis zu kastaniengrosser Geschwülste. Diese Geschwülste waren teils grauweiss, teils gelbweiss. Auch im kleinen Becken war ein Wirrwarr aus sich kreuzenden, ungleichförmig verdickten Strängen mit bis zu bohnergrossen Auftreibungen vorhanden.

Das *Gehirn* bot nichts Abnormes dar weder an seiner Oberfläche noch in den Häuten. Sämtliche Hirnnerven boten normale Verhältnisse dar. An der Innenseite des Schädels über dem linken Occipitallappen sass ein zehnnöregrosser flacher, leicht prominierender Tumor, und diesem entsprechend war auch an der Innenseite der Dura mater ein weizenkorngrosses, grauweisses Knötchen.

Am *Rückenmark* war nichts Abnormes zu bemerken, —

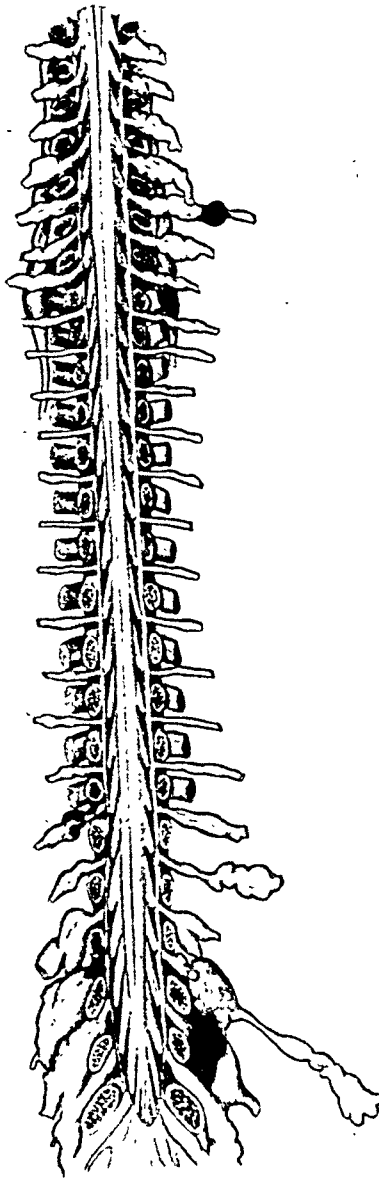


Fig. 4.

keine Infiltrationen in den dünnen Häuten und auch nicht sub- oder extradural. Dagegen waren sämtliche Spinalnerven erheblich verdickt von der Austrittsstelle aus dem Rückenmark ab, also auch ihre Wurzeln; sie waren griffel- bis kleinfingerdick, jedoch ungleichmässig verdickt mit Anschwellun-

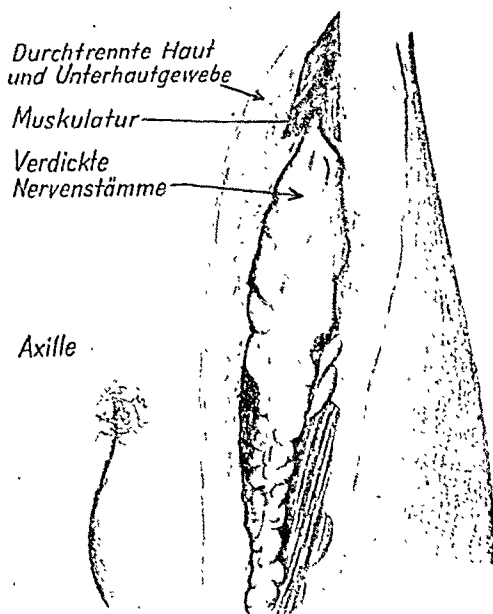


Fig. 5.

gen, die die Grösse einer Paranuss erreichten (Fig. 4). Die grössten Anschwellungen wurden oben im Cervicalteil vorgefunden, ferner unten in der Cauda equina, wo pflaumengrosse und grössere Geschwülste sich fanden. Die letztgenannten gingen in dünnere Nervenstämmе über die ihrerseits spindelförmige Auftreibungen zeigten. Im Thorakalteil war ein walnussgrosser Tumor an einem der Nerven vorhanden. Ausserdem waren auch die verbindenden Äste zwischen den Spinalnerven verdickt und bildeten knotige Stränge. In einer Reihe der Knoten an den Spinalnerven waren dunkle rote oder blau-rote Flecken zu sehen, die wenig scharf begrenzt waren. Ein

Teil derselben ist in die schematische Wiedergabe des Rückenmarks mit Spinalnerven und Geschwülsten eingezeichnet (Fig. 4).

An den *Oberarmen* waren die Plexus mit ihren Nervenästen kolossal verdickt, bis daumendick, grössere Konglomerate aus verfilzten Strängen bildend (Fig. 5). Auch an den *Oberschenkeln* waren die Nervenplexus in derselben Weise verändert, angeschwollen und verdickt, aber nicht in so ausgesprochenem Masse wie an den Armen.

Mikroskopische Untersuchung.

Bei der Untersuchung von *zerstreuten Knoten* von einer Reihe von verdickten Nerven an den Oberarmen, Intercostalnerven und Spinalnerven mit Knötchen von verschiedener Grösse wurde folgendes beobachtet: In den am wenigsten verdickten Nerven sah man Gruppen von bewahrten Nervenfasern mit ihre Myelinscheiden, daneben sah man jedoch Proliferation eines neugebildeten Gewebes, das am ehesten wie Bindegewebe aussah und aus proliferierenden, langen spindelförmigen Zellen bestand, durch Fibrillen von einander getrennt, die sich allmählich (mit van Gieson) rötlich färbten. Ob dies Gewebe aus den Zellen des Endoneuriums oder der Schwannschen Scheiden hervorgegangen war, ist eine Frage für sich. In den grösseren Knoten veränderte dieses Gewebe allmählich seinen Charakter; das Gewebe wurde mehr fibrillär, an vielen Stellen verhältnismässig zellarm, und es trat auch Ödem zwischen den Fasern auf. In stärker verdickten Nerven wechselten zellarme und zellreiche Partien miteinander ab, und schliesslich verschwanden die Nervenfasern. Das Perineurium dagegen blieb so gut wie überall erhalten in Gestalt eines ziemlich derben, konzentrisch angeordneten Häutchens. In den grösseren Knoten an den Spinalnerven waren bloss wenige Nervenfasern bewahrt, und das Ganze machte am ehesten den Eindruck einer *fibromähnlichen Geschwulst*, jedoch von stark wechselndem Zellreichtum.

In Schnitten aus der *extrapulmonalen Geschwulst* sah man

in erster Linie ein zellreiches Gewebe, annähernd vom Aussehen eines Spindelzellensarkoms, mit langen spindelförmigen Zellen mit in die Länge gezogenen Kernen, spärlichem Proto-



Fig. 6.

Mikrofoto. 60fach. Beginnende Entwicklung eines Hämangioms; zahlreiche, verzweigte Gebilde mit zentralem spaltförmigem Lumen, von proliferierendem Endothel umgeben.

plasma und undeutlicher Interzellulärsubstanz Die Zellen waren zu Bündeln geordnet, die einander in allen Richtungen kreuzten; eigentliche Wirbel sah man jedoch nicht, an einzelnen Stellen dagegen Andeutungen von solchen. Ferner beobachtete man Übergängen in ein zellreicheres Gewebe mit wechselnderen Zellformen, die auch meistens etwas grösser

waren, indessen keine eigentlichen mehrkernige Zellen. Im grossen und ganzen glich das Gewebe einem *Spindelzellensarkom* und einem *polymorphzelligen Sarkom*.

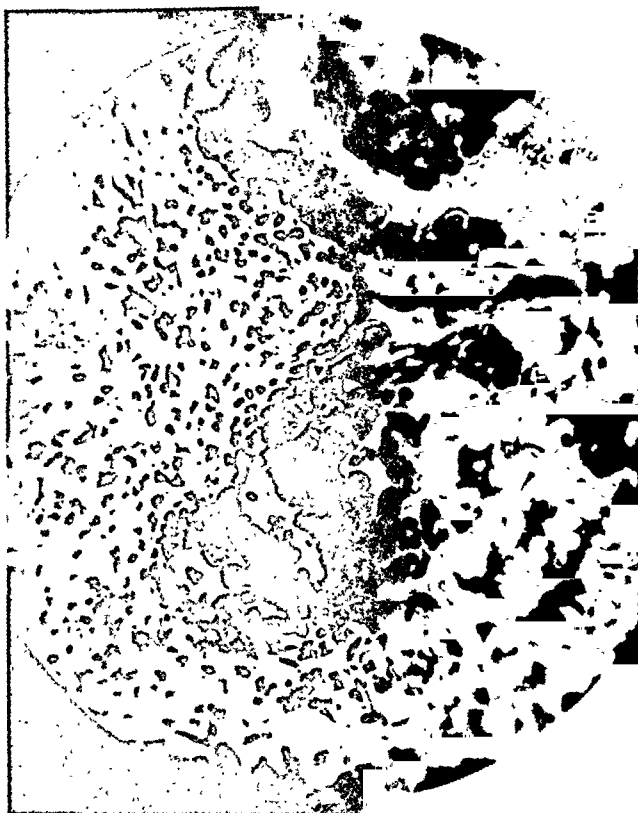


Fig. 7.

Mikrofoto. 360fach. Dasselbe Präparat wie in Fig. 6. Zwei grössere hamangiomatöse Räume, von proliferierendem Endothel umrahmt und teilweise von demselben Endothel ausgefüllt. Links neurofibromatöses Gewebe.

Neben diesem Gewebe, das als das übliche Bild einer ausgeprägten Neurofibromatose angesehen werden darf, allerdings unter Ausbildung von zellreichen Partien, wurde aber noch *ein zweiter wichtiger mikroskopischer Befund* erhoben, und zwar einerseits in den gewöhnlichen neurofibromatösen Knoten, andererseits vornehmlich in den *dunklen Flecken*

und dunklen Knoten an den Spinalnerven und schliesslich am ausgeprägtesten in dem grossen Tumor im Thorax und in den metastatischen Knoten auf dem Zwerchfell und der Dura



Fig. 8.
Mikrofoto. 60fach. Beginnendes Hämangiom in einer neurofibromatösen Geschwulst. In der Mitte ein grösserer blutgefüllter Raum, von proliferierendem Endothel umrahmt und von Endothelknospen teilweise angefüllt.

mater. Im Innern der neurofibromatösen Geschwulstmassen sah man nämlich an vielen Stellen zahlreiche kleine Blutgefässe mit in Wucherung befindlichem Endothel; das Endothel bildete Schläuche mit etwas unregelmässiger Verteilung der endothelialen Zellen. Dieses Gewebe zeigte alle Übergänge

waren, indessen keine eigentlichen mehrkernige Zellen. Im grossen und ganzen glich das Gewebe einem *Spindelzellensarkom* und einem *polymorphzelligen Sarkom*.

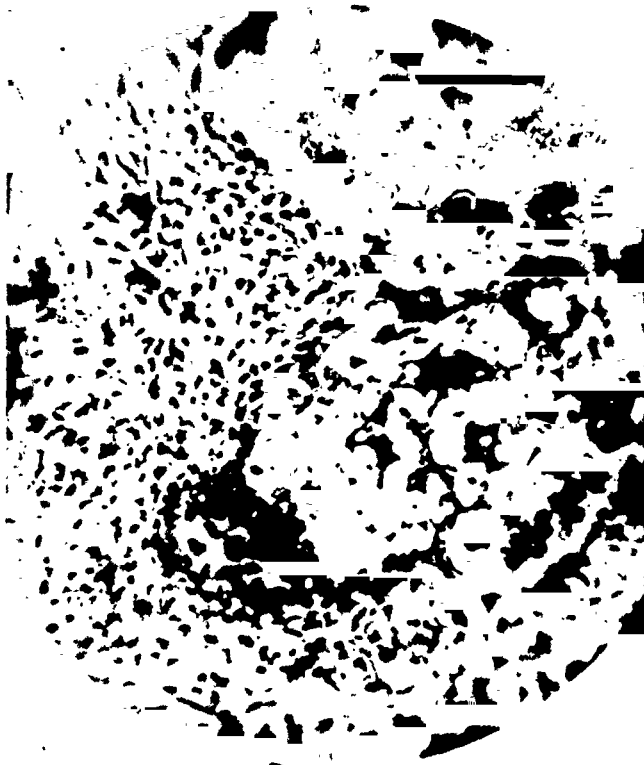


Fig. 7.

Mikrofoto. 360fach. Dasselbe Präparat wie in Fig. 6. Zwei grössere hamangiomatöse Räume, von proliferierendem Endothel umrahmt und teilweise von demselben Endothel ausgefüllt. Links neurofibromatöses Gewebe.

Neben diesem Gewebe, das als das übliche Bild einer ausgeprägten Neurofibromatose angesehen werden darf, allerdings unter Ausbildung von zellreichen Partien, wurde aber noch ein *zweiter wichtiger mikroskopischer Befund* erhoben, und zwar einerseits in den gewöhnlichen neurofibromatösen Knoten, andererseits vornehmlich in den *dunklen Flecken*

und dunklen Knoten an den Spinalnerven und schliesslich am ausgeprägtesten in dem grossen Tumor im Thorax und in den metastatischen Knoten auf dem Zwerchfell und der Dura



Fig. 8.
Mikrofoto. 60fach. Beginnendes Hämangiom in einer neurofibromatösen Geschwulst. In der Mitte ein grösserer blutgefüllter Raum, von proliferierendem Endothel umrahmt und von Endothelknospen teilweise angefüllt.

mater. Im Innern der neurofibromatösen Geschwulstmassen sah man nämlich an vielen Stellen zahlreiche kleine Blutgefässe mit in Wucherung befindlichem Endothel; das Endothel bildete Schläuche mit etwas unregelmässiger Verteilung der endothelialen Zellen. Dieses Gewebe zeigte alle Übergänge

in ein höchst eigentümliches Gewebe, bestehend aus grösseren langen Schläuchen oder Haufen, innen von Endothel ausgekleidet und teils von reinem Blut angefüllt, teils von knospen-

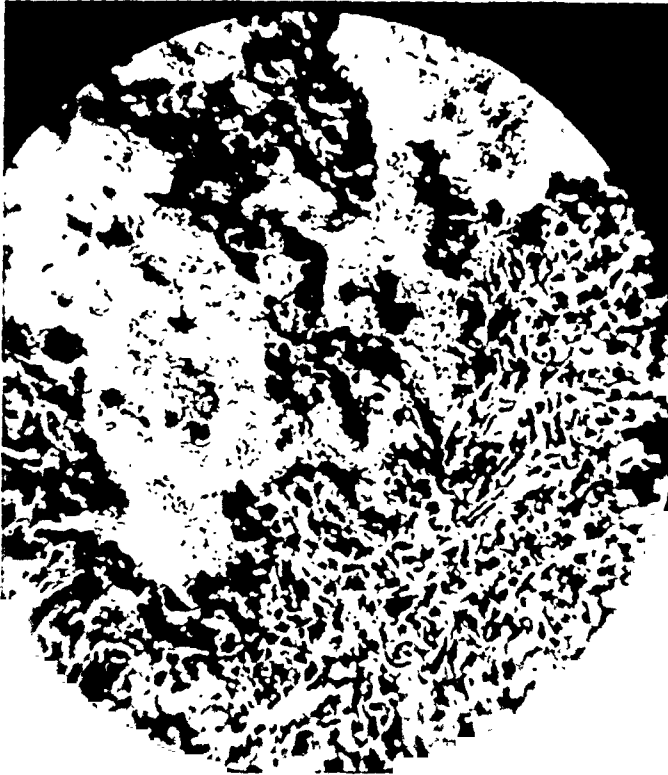


Fig. 9.

Mikrofoto. 360fach. Dasselbe Präparat wie in Fig. 8. Ein grösserer blutgefüllter Raum, von Endothel umrahmt und teilweise von Endothelknospen ausgefüllt. Rechts unten neurofibromatöses Gewebe.

artigen Endothelproliferationen. Diese Partien waren sehr zell- und blutreich. In den blauroten Knoten (sowohl in den gewöhnlichen Geschwulstknoten als auch in dem grossen intrathorazischen Tumor) fand man alle Übergänge in ein rein *hämangioma*töses Gewebe mit kleineren und grösseren blutgefüllten Räumen und Spalten, alle innen von dem genannten

Endothel ausgekleidet, das an vielen Stellen papillenartig in das Lumen hinein vorsprang.

In den mutmasslich metastatisch entstandenen blauroten



Fig. 10.

Mikrofoto. 60fach. Von einem Knoten (Metastase) aus der Dura mater. Hämangiomatöses Gewebe: Grössere und kleinere Räume und Spalten, sämtliche von Endothel umrahmt und mit Blut gefüllt.

Knoten auf dem *Zwerchfell* wurde ausschliesslich ein schwammiges blutreiches Gewebe gefunden mit stark wucherndem Endothel, — eine Art weitergehende Entwicklung des ähnlichen Gewebes, das u. a. in der Thoraxgeschwulst angetroffen wurde. An der Peripherie dieses Gewebes fanden sich

gern kleine lange Schläuche mit wucherndem Endothel. Weiterhin zeigte es sich, dass der Knoten auf der *Dura mater* den gleichen Bau aufwies; er bestand aus wuchernden endo-

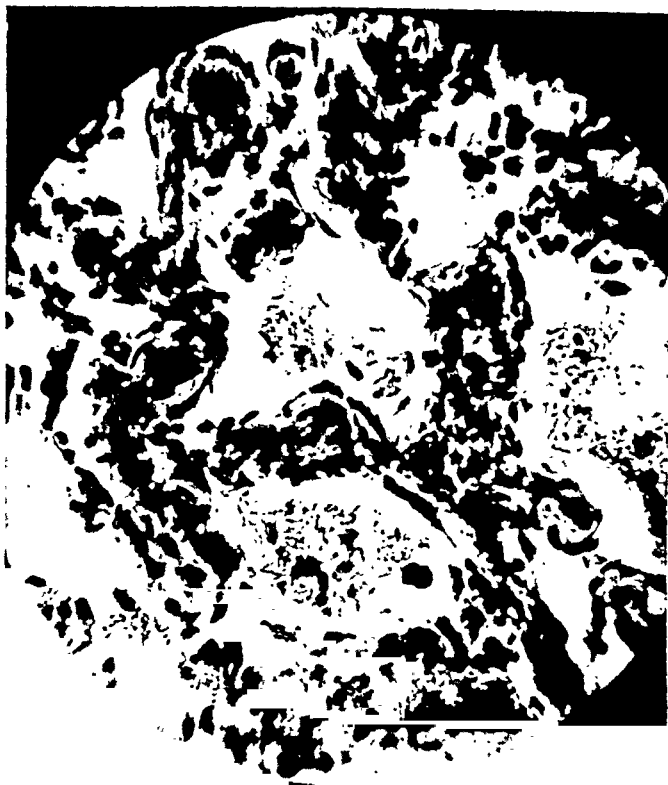


Fig. 41.

Mikrofoto. 360fach. Dasselbe Präparat wie in Fig. 10. Metastase aus der *Dura mater*. Blutgefüllte, von Endothel umrahmte Räume.

thelialen Massen, die von blutgefüllten Spalten und Räumen durchsetzt waren. Die Grösse und Form der Endothelzellen wechselte stark; auch mehrkernige Zellen waren in geringer Zahl vorhanden, dagegen keine eigentlichen Riesenzellen. An keiner einzigen Stelle fand man in diesem hlauroten, schwammigen Gewebe etwas, was an Neurofibrome erinnerte.

Diagnosen:

Die Knoten in den Nerven und Spinalganglien zeigten die bei »*Neurofibromatose*« übliche Struktur, — d. h. sie hatten einigermassen die Struktur einer mesenchymalen Geschwulst. Im grossen und ganzen war dies auch der Fall bei der Geschwulst in der Brusthöhle, die als eine Weiterentwicklung der von den Spinalganglien ausgehenden Knoten angesehen werden darf, doch war dieser Tumor zellreicher und erinnerte mehr an ein *Spindelzellensarkom*. Schliesslich wurde sowohl in der Thoraxgeschwulst als auch in den dunklen Partien der Geschwülste an den Spinalnerven ein ganz andersartiges Geschwulstgewebe gefunden, das aus proliferierenden kleinen Blutgefässen bestand mit allmählichem Übergang in ein *Hämangiom*, — ein Haemangioma endotheliomatosum, oder wenn man will, ein »*Endothelioma haemangiomatosum*«. Endlich fanden sich Übergänge von diesen Endothelproliferationen in ein schwammiges, blutreiches Gewebe, aus dem die Geschwulstknoten auf dem Zwerchfell und der Dura mater ausschliesslich aufgebaut waren, die als *Metastasen* aufgefasst wurden, — also gewissermassen ein *Hämangiosarkom mit Metastasen*.

Das Interesse bei dieser Sippengeschichte knüpft sich in erster Linie an die ausgesprochene Erbllichkeit der Krankheitsanlage (vgl. die Sippentafel). Man hat auch den Eindruck als ob der Krankheitsverlauf ein schnellerer und die Geschwülste bösartiger würden (eine Erfahrung, die übrigens auch andere gemacht haben, z B. *Hoekstra*) — allenfalls in der 3. Generation — mit einem möglicherweise etwas milderen Verlauf in der 4. Generation; es ist aber vorläufig verfrüht sich darüber zu äussern.

Was die Erbanlagen betrifft, so war diese, wie oben erwähnt, bei sämtlichen 9 Kindern der M. K. vorhanden, welche den Ausgangspunkt dieser traurigen Sippengeschichte bildet, und da Krankheitsfälle auch in einer Generation vor ihr auftraten und nun auch bei den Kindeskindern der M. K. auf-

zutreten beginnen, lässt sich die Krankheit demnach über 4 Generationen hinweg verfolgen.¹⁾ Und in allem Wesentlichen ist es das gleiche Krankheitsbild, welches auftritt: Pigmentierungen und Geschwülste der Haut, ferner, und zwar meistens etwas später, Auftreten von zahlreichen Geschwülsten in Nerven, — es handelt sich demnach um typische Fälle von multipler Neurofibromatose oder v. Recklinghausenscher Krankheit. Die Krankheit tritt indessen in etwas verschiedenen Äusserungsformen auf und wechselt etwas in ihrer Ausbreitung. Auch die Struktur wechselt (abgesehen von den Pigmentationen, die bei so gut wie Sämtlichen, wenn auch in verschiedener Stärke gefunden wurden); teils handelt es sich, und zwar hauptsächlich um begrenzte Neurofibrome, die sogar in so gut wie allen Nerven vorkamen; teils um plexiforme Neurome, diffus oder in einem einzigen Nervenplexus ausgebreitet, so z. B. in der Schläfe bei Frau M. K. und merkwürdigerweise an derselben Stelle bei mehreren Vertretern der 2. und 3. Generation; teils um diffuse Verdickungen der Haut (Elephantiasis neurofibromatosa); teils schliesslich um eine diffuse Neurinommatose oder Gliomatose so gut wie sämtlicher Nerven und Nervenplexus (u. a. sehr ausgesprochen im Plexus lumbosacralis und in der Cauda equina bei Gen. III₄, sowie in den Rückenmarks- und Hirnhäuten bei Gen. III₆).

Ungeachtet des etwas verschiedenartigen Krankheitsbildes lässt sich die Krankheit von Generation zu Generation als *dominant erbliches Leiden* verfolgen.

Meiner Ansicht nach leiden sämtliche 9 Kinder in der 3. Generation an v. Recklinghausenscher Krankheit, jedoch haben, wenigstens vorläufig, nur die 6 ältesten die Krankheit in ausgesprochenem Grade, während die 3 jüngsten bislang nur Pigmentmaler aufweisen. Es ist daher denkbar, dass das erbliche Prinzip zwei Erbfaktoren (als Allenen- oder Allelomorphen) umfasst, von denen der eine Pigmentanomalien, der andere

¹⁾ In meiner Monographie über multiple Neurofibromatose habe ich 1909 einen Fall von »Elephantiasis neurofibromatosa« beschrieben, wo sich die Erbanlage durch 5 Generationen hindurch verfolgen liess (Fall Nr. 30).

dagegen das ganze Krankheitsbild (bestehend aus Geschwülsten und Pigmentierungen) hervorruft. Eine derartige Annahme würde erklären, warum sämtliche Kinder von der Krankheit befallen sind, indem man annehmen könnte, dass die Mutter eine »compound« ist, d. h. dass sie den einen Faktor von ihrem Vater, den anderen von der Mutter geerbt hat.

Unser Interesse erwecken ferner die verschiedenen Arten von Geschwülsten, welche vorgefunden wurden in dem zuletzt beschriebenen Falle, besonders die Entwicklung von Hämangiosarkomen, deren Entstehung von den ersten Anfängen an verfolgt werden konnte. Die an den Nerven angetroffenen Knoten erwiesen sich zum allergrössten Teil als gewöhnliche Neurofibrome, übrigens ohne Bildung eigentlicher Wirbel (es waren also keine typischen Neurinome). Die Geschwulst in der linken Thoraxhöhle nimmt indessen eine Sonderstellung ein, diese war nämlich erheblich zellreicher und zeigte in grossen Teilen der Geschwulst nahezu das Bild eines Spindelzellensarkoms oder eines polymorphzelligen Sarkoms.¹⁾

Übergänge in atypische Geschwülste, gegebenenfalls in Sarkome kommen nicht selten vor neben den Geschwülsten in Nerven und Haut. In meiner ersten Arbeit über multiple Neurofibromatose aus dem Jahre 1909 (l. c.) konnte ich nach Durchsicht der Literatur und auf dem Boden eigener Erfahrungen anführen, dass bei etwa 12 % aller Fälle eine derartige Entwicklung nachweisbar ist. In der genannten Arbeit wurde auch zwei solch Fälle beschrieben nämlich Nr. 31, eine 44jährige Frau, und Nr. 32, eine 31jährige Frau, mit multiplen Neurofibromen und Spindelzellensarkomen. In einer späteren Arbeit beschrieb ich 1916 einen dritten Fall, nämlich

¹⁾ Dieser Tumor entspricht in seinem Aussehen einigen der Geschwülste, die von Prof. P. Bull in seinen 3 Arbeiten über intrathorazische Geschwülste geschildert wurden (Norsk Mag. f. Lægevid. 90, 329 (1929); 92, 1110 (1931); 97, 329 (1936)). Bulls Fall Nr. 5 war ein kokusnussgrosser Neurofibrom (1931); in seiner letzten Arbeit beschreibt B. ein kindskopfgrosses Fibrosarkom bei einem 39jährigen und ein Neurofibrom am Übergang in ein Sarkom bei einem 35jährigen (Fall Nr. 8 und 9).

den einer 18Jährigen mit Neurofibromen und Sarkoma fusocellulare am Halse. Hosoi¹⁾ sammelte 466 Fälle und stellte fest, dass es bei 59 Fällen zur Ausbildung atypischer Geschwülste kam, d. h. bei etwa 13 %.

Die Entwicklung scheint in diesen Fällen in einer gradweise raschen Zunahme des Zellreichtums zu bestehen ohne Auftreten von eigentlich neuen Zelltypen mit Übergängen in Spindelzellensarkom und polymorphzelliges Sarkom.

Von etwas abweichender Art war die Entwicklung bei einem der Fälle in der von mir beschriebenen Familie mit multipler Neurofibromatose, nämlich bei Nr. 6 der 9 Geschwister in der dritten Generation; der Fall ist von mir bereits 1932 veröffentlicht. Hier wurde nämlich ein stark progressives und ausgesprochen diffuses Wachstum eines gliaähnlichen, verhältnismässig zellarmen Gewebes in den Rückenmarks- und Hirnhäuten und in den Hirnhöhlen vorgefunden, — eine diffuse »Gliomatose« oder »Neurinomatose« — jedoch ohne eigentliche Metastasen.

Es dürfte auch bekannt sein, dass man nicht selten eine Kombination einer multiplen Neurofibromatose mit anderen Geschwülsten im Nervensystem nachweisen kann, so besonders mit *Gliomen* und *Meningiomen*.²⁾ Unter den Verfassern, die sich mit dieser Frage beschäftigten, sei hier *Schnyder* (1928)³⁾ erwähnt, insbesondere bezüglich der multiplen Meningiome und Kombinationen von solchen mit anderen Geschwülsten innerhalb und ausserhalb des Nervensystems. Ferner *Hosoi* (1930⁴⁾ und *Hans Fr. Harbitz*⁵⁾ der eine grössere

¹⁾ Hosoi: Archives of Surgery, 22, 258 (1931).

²⁾ Ein auch eigentlich zu diesen gehöriger Fall wurde von mir zusammen mit Dr. Lossius im Jahre 1929 beschrieben; hier kamen gleichzeitig vor ein Meningiom hinter der Medulla oblongata, ein gliomatöser Stift im Rückenmark mit Zerfall und Höhlenbildung, eine grosse geschwulstartige Masse, ebenfalls mit Höhlenbildung, in den Rückenmarkshäuten und schliesslich eine Arachnitis ossificans (Acta psych. et neurolog. Scand. 4, 51, 1929).

³⁾ *Schnyder*, Institut Orell Füssli, Zürich (1928).

⁴⁾ *Hosoi*, The Amer. J. of Pathol. 6, 245 (1930).

⁵⁾ *Hans Fr. Harbitz*, Acta pathol. et microbiol. Scand. 12, 24 (1935).

Kasuistik aus dem von mir geleiteten pathologisch-anatomischen Institut des Rikshospitals sammelte, welche die Frage des Vorkommens multipler Geschwülste beleuchten sollte sowie versuchte eine allgemeingültige Erklärung zu geben. Letztere nahm ihren Ausgangspunkt in der Annahme einer gemeinsamen Abstammung der neuroektodermalen Geschwülste wie auch der ektodermalen Geschwülste mit mesenchymaler Struktur (Neurofibrome, Meningiome, ja sogar Angioblastome) nämlich aus der »neutral crest« aus der vielerlei Gewebe hervorgehen, darunter auch das Neurilemma, d. h. die Schwannsche Scheide. Anomalien der Entwicklung dieser Christa könnten die Erklärung abgeben für die spätere Entwicklung von Geschwülsten von ziemlich verschiedenartigem Bau. Diese Deutungsweise stimmt auch überein mit den von anderen, z. B. *Bayley* und *Bucy*, sowie von französischen Forschern, wie *Lhermitte*, *Oberling*, *Roussy*, geltend gemachten Anschauungen.

Sei es nun mit der embryologischen Grundlage wie es wolle, Tatsache ist, dass die genannten Geschwülste einander recht nahe stehen und erfahrungsgemäss oft nebeneinander vorkommen.

Man muss auch annehmen, dass die multiple Neurofibromatose verwandtschaftliche Beziehungen zeigt zu einer Reihe geschwulstartiger Bildungen oder Anomalien des Nervensystems auf angeborener Grundlage, so mit der *tuberösen Hirnsklerose*, einer Krankheit, die in den letzten Jahren erhebliche Aufmerksamkeit auf sich gelenkt hat. Es zeigte sich nämlich dass diese Krankheit ausser durch Knoten im Gehirn charakterisiert ist durch Anomalien der Haut (Adenoma sebaceum, die sog. Pringlesche Krankheit), Anomalien des Auges (Phakome), sowie verschiedenen Geschwülste in den inneren Organen, u. a. im Herzen (Rhabdomyome) in den Lungen und in den Nieren (Myxo-Liposarkome). Ein charakteristisches Beispiel dieser Krankheit wurde von mir im Jahre 1912 beschrieben.¹⁾ Im norwegischen medizinischen Schrifttum

¹⁾ Norsk Mag. Lægevid. 73, 997 (1912).

liegt übrigens über diese Krankheit eine kürzlich erschienene Arbeit von Dr. *Kveim vor*,¹⁾ der sich namentlich mit der engen Beziehung zur Neurofibromatose befasste, welche diese Krankheit zu besitzen scheint. Dr. Kveim hebt hervor, dass man es hier eher mit einer Entwicklungsstörung als mit einer echten Geschwulstbildung zu tun habe, — einer fehlerhaften fetalen Entwicklung des ekto- und mesodermalen Gewebes —, u. a. aus dem Grunde weil die vorgefundenen Geschwülste weder infiltrierendes Wachstum zeigen noch Metastasen geben. (Ob das richtig ist, ist jedoch zweifelhaft; der von mir 1912 beobachtete Fall wies jedenfalls sowohl Metastasen wie infiltrierendes Wachstum auf).

Die zwischen diesen beiden Krankheiten bestehende Verwandtschaft wurde in neuerer Zeit auch von Dr. *Eiler Schiötz*²⁾ und besonders von Dr. *Scherer*³⁾ in seinen Studien über den Bau der Geschwülste im peripheren Nervensystem betont.

Grösseres Interesse für uns besitzt indessen die Erfahrungstatsache, dass man auf Fälle von multipler Neurofibromatose stossen kann, die gleichzeitig *Hämangiomasen* verschiedener Art und Lokalisation aufweisen können, wodurch eine nahe Beziehung zwischen diesen beiden Krankheiten wahrscheinlich gemacht wird. Dies sieht man z. B. beim Hippelschen und beim Lindauschen Syndrom (Hämangiome in Retina und Zentralnervensystem, besonders im Cerebellum), wo jeweils zu gleicher Zeit verschiedene andere Geschwülste vorgefunden werden, so in Pankreas, Nieren, Milz usw., und unter diesen Geschwülsten findet man auch nicht selten multiple Neurofibrome. *Lindau* machte hierauf bereits in seiner Monographie 1926⁴⁾ aufmerksam. Von norwegischen Verfassern, die auf diesen Sachverhalt aufmerksam waren, seien erwähnt *Eiler Schiötz* (1935), *Hans Fr. Harbitz* (1935) und *A. Kveim* (1937) (l. c.).

¹⁾ Acta dermato-venerol. 18, 637 (1937).

²⁾ Norsk Mag. Lægevid. 96, 737 (1935).

³⁾ Virchow's Archiv 292, 479 (1934).

⁴⁾ Acta pathol, microbiol. Scand. Suppl. 1926.

Bezüglich dieser krankhaften Zustände wird gewöhnlich angenommen, dass die Hämangiomatosen hinsichtlich ihres Ursprungs der multiplen Neurofibromatose an die Seite zu stellen sind und als angeborene Leiden aufzufassen sind, gewissermassen als eine Art weitergehende Entwicklung einer Missbildung, d. h. als Geschwulstbildungen auf dysontogenetischer Basis (lokale Gewebsabsprengung). In noch höherem Masse gilt dies von der tuberösen Hirnsklerose.

In dem von mir oben eingehender beschriebenen Fall von Neurofibromatose fanden sich indessen Hämangiome, die in bezug auf ihre Genese anders aufgefasst werden müssen. Die Gefässaffektion trat nämlich hier gleichzeitig an vielen Stellen auf im Innern der neurofibromatösen Geschwülste, und zwar trat sie in den verschiedensten Entwicklungsstadien auf. Hier wurden nicht nur vollentwickelte, blutgefüllte kavernöse Hohlräume angetroffen mit proliferierendem Endothel, das hier und dort kleine Vorsprünge bildet, sondern daneben, was wichtiger ist, eine Gefässaffektion in ihren ersten Anfängen; dem Anschein nach normale von Endothel bekleidete Kapillargefässe entwickeln sich in etwas grössere Gefässe mit dickeren Wänden und wucherndem mehrschichtigem Endothel, und von diesen finden sich Übergänge in die obengenannten kavernösen Hohlräume. Es sieht so aus als nähmen Zellreichtum und Wucherungsvermögen dauernd zu.¹⁾

Dazu kommen noch als weiterer sekundärer Befund ausgesprochenen typische Metastasen zum Diaphragma und zur Dura mater, wir haben es hier demnach mit Hämangiosarkome mit Metastasen zu tun, — einer atypischen Geschwulst von völlig andersartigem Bau als die ursprüngliche, — die

¹⁾ In dem Fall von tuberöser Hirnsklerose, den ich im Jahre 1912 beschrieb (l. c.), fanden sich gleichzeitig symmetrische Geschwülste in den Nieren, die sich teilweise als Fibro-Angio-Sarkome erwiesen, d. h. atypische Proliferationen endothelialer und adventitieller Zellen, z. T. in Gestalt dicker arterienähnlicher Gebilde. Hier lag also in gewissem Sinne eine Entwicklung von Hämangiomen in andere Geschwülste, in casu Sarkome, vor; Neurofibromatose war dagegen nicht vorhanden.

im Innern und vermutlich auf Grund einer neurofibromatösen Geschwulst entstanden war. Diese tritt nun multipel an verschiedenen Stellen auf. Man bekommt den Eindruck, dass es sich hier um einen *sekundären, erworbenen Zustand* handelt, — ausgelöst durch die zahlreichen Geschwulstknoten und strangförmigen Infiltrate in den Nerven, die überall angetroffen werden, — eine »hyperplasiogene« Geschwulstbildung auf irritativer Grundlage, also im Gegensatz zu der Geschwulstentstehung auf »dyontogenetischer« Basis, die bei den neurofibromatösen Geschwülsten vorausgesetzt werden darf. Jedenfalls ist, wie auch immer die Erklärung lautet, diese multiple Geschwulstbildung hämangiomatösen Charakters höchst bemerkenswert als mutmasslich sekundäre Erscheinung; eigentlich ist es auch aus diesem Grunde, dass ich es der Mühe wert fand den Fall eingehend zu schildern. Eine derartige sekundäre multiple Geschwulst auf der Grundlage einer anderen bereits bestehenden ist, dem Schrifttum nach zu urteilen, anscheinend eine seltene Vorkommnis und verdient daher veröffentlicht zu werden.

Unsere Sippentafel, wenn man sie in ihrer Gesamtheit betrachtet, lässt indessen noch zu weiteren Überlegungen ein, nämlich durch das *multiple Vorkommen von Geschwülsten* in der Sippe überhaupt, — nicht nur von abnormen Pigmentierungen und multiplen Neurofibromen sowie den zuletzt beschriebenen Hämangiomen, sondern auch von *Karzinomen* und *anderen Geschwülsten*. Der Vater der 9 mit Neurofibromatose behafteten Kindern starb an Dickdarmkrebs, die »Stammutter« mit den plexiformen Neurofibromen in den Augenlidern usw. hatte auch einen grossen Cancer ventriculi, der im Januar 1931 durch Operation entfernt wurde, — ohne dass sich später sonderbarerweise ein Rezidiv eingestellt hätte. Dieser Ventrikeltumor, den zu studieren ich Gelegenheit hatte, hatte übrigens einen etwas eigentümlichen Bau. Unzweifelhaft zeigte er den Bau eines Adenocarcinoms mit grossen Zylinderelementen, wies aber daneben einen mächtigen Reichtum an Blutgefässen und blutgefüllten Hohlräumen mit starker Endothelwucherung auf, — d. h. ein Bild, das an manchen Stellen an

ein Hämangiom erinnerte. Ob diesem Befund irgendwelche Bedeutung beigemessen werden kann ist recht zweifelhaft.

Dagegen ist es von grösserem Interesse, das bei den beiden Eltern der 9 Kinder mit multipler Neurofibromatose (v. Recklinghausenscher Krankheit) Krebs auftrat; es scheint daher, dass in der Familie auch zu anderen Geschwülsten als zu Neurofibromen Anlagen vorhanden sind. Gleichsinnige Erfahrungen wurden von mir auch schon früher gemacht. In der Kasuistik, die ich in meiner Arbeit über multiple Neurofibromatose 1909 veröffentlichte, werden ähnliche Fälle mitgeteilt, nämlich Nr. 33, eine 55jährige mit multiplen Neurofibromen und gleichzeitiger Carcinoma ovarii mit Metastasen und Sarkom in der Radix mesenterii, und Nr. 34, eine 51jährige Frau mit einem Karzinom der Zunge neben v. Recklinghausenscher Krankheit. Später (1932) teilte ich einen weiteren Fall mit, eine 49jährige betreffend mit multiplen Neurofibromen sowie Glioma cerebri, Hämangiomen der Haut und Fibromen der Gebärmutter. Handelt es sich hier um ein zufälliges Zusammentreffen oder um den Ausdruck einer allgemeinen Geschwulstanlage, einer »allgemeinen Blastomatose«, wie man dies auch nennt, mit einer Entwicklung von Geschwülsten sowohl ektodermalen wie mesodermalen Ursprungs? In meiner 1916 erschienenen Arbeit (über das gleichzeitige Vorkommen mehrerer selbständig wachsender Geschwülste) habe ich eine reichhaltige Kasuistik mitgeteilt, die das Vorkommen multipler Geschwülste der verschiedensten Art beleuchtet, worauf ich hier hinweisen möchte (l. c. — Ziegler's Beitr. z. allg. Path. u. Pathol. Anal. 62: 503, 1916).

Zusammenfassung.

Multiple Neurofibromatose, eine erbliche Krankheit mit Übergängen in andere Geschwulstformen (Gliomatose, Spindelzellensarkom, Hämangiosarkom).

Verf. schildert eine Familie, die von ihm während der letzten 37 Jahre verfolgt und viele Male untersucht wurde, in welcher multiple Neurofibromatose (von Recklinghausen-

sche Krankheit) als dominante Erbkrankheit in 4 Generationen auftrat. In der 3. Generation war die Krankheit bei sämtlichen 9 Kindern der »Stammutter« nachweisbar. (Die Mutter hatte plexiforme Neurofibrome, multiple Geschwülste und Pigmentierungen). Von den 9 Kindern starben 2 an der Krankheit, so ein Knabe im Alter von 9 Jahren; diesen hatte multiple Neurofibrome in so gut wie sämtlichen Nerven und starb an Gliomatose (oder Neurinomatosse), die in den Meningen, besonders längs der Medulla spinalis und Oblongata und an der Hirnbasis ausgebreitet war. Das andere Kind war eine Tochter, die mit 23 Jahren an einer grossen intrathorazischen Geschwulst starb, die von einem Nervenstamm im Thorax ausging. Daneben zeigte es sich, dass viele der Neurofibrome bei ihr Hämangiome enthielten, welche Übergänge zeigten in Hämangiosarkome, die u. a. nach den Hirnhäuten metastasiert hatten. Die grosse intrathorazische Geschwulst bestand grossenteils aus derartigem Gewebe, im übrigen zeigte sie den Bau eines Spindelzellensarkoms. — Verf. ist der Meinung, dass die multiplen Neurofibrome, die ihre Entstehung einer angeborenen Anlage verdanken, den Anlass gaben zur Entwicklung der multiplen Hämangiosarkome.

Summary.

Multiple neurofibromatosis, an inborn disease with transition to other forms of tumors (gliomatosis, fusocellular sarcoma, and hæmangiosarcoma).

The author reports of a family, followed up and examined by him many times during 37 years, in which multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen's disease) appeared as a dominant hereditary disease in four generations. In the third generation the disease was present in all of the 9 children of the »ancestress«, (who had plexiform neurofibromas, and multiple tumors and pigmentations). Of these 9 children 2 died of the disease. One of these, a boy died at the age of

9 years; he had multiple neurofibromas in practically every nerve in his body, and died of gliomatosis (or neurinomatosis), spreading in the meninges, especially along the medulla spinalis and oblongata, and on the base of the brain. The other, a girl, who died, when she was 23 years old, of a large intrathoracic tumor that had developed in a nerve stem in the chest. Besides, it was shown, that in many of the neurofibromata in this case there were hæmangiomata with transitions to hæmangiosarcomata, which had formed metastases, among others in the meninges. The large intrathoracic tumor greatly consisted of tissue of this kind, while for the rest it was a fusocellular sarcoma. — The author is of the opinion that the multiple neurofibromata, which were of inborn origin, had given rise to the development of the multiple hæmangiosarcomata observed.

A NEW METHOD OF STERILIZATION WITH PARTICULAR REFERENCE TO CATGUT MANUFACTURE.

PRELIMINARY ANNOUNCEMENT.

By *Henry M. Christensen.*

Ever since *Lister* sterilized surgical catgut for the first time and thereby demonstrated the possibility of employing this absorbable material for buried ligatures and sutures, there has been a constant procession of sterilizing processes.

The appearance of all these processes is explained by the fact that it has always been a most difficult matter effectively to sterilize the intestinal material in the greatly modified form used for catgut, if at the same time its properties of being absorbable, strong and supple are to be retained.

The microbes infecting the material are apt to be widely different in nature, but the only types of significance to the present question are those producing spores, as already pointed out by *Knorr* (1931), and particularly the highly resistant, sometimes pathogenic, germinative spores which the original material must always be expected to contain. Even when this material is procured under the best possible control, as specified by e.g. *Kuhn* (1907) and *Bullock* (1929), there will always be the bacteria content of the intestine itself as an unavoidable source of infection; and the very fact that butchers and workmen have to do with the preliminary handling of the guts before they arrive at the stage of actual manufacture is enough to preclude really sterile treatment.

It is possible that in the early days of sterilized catgut the material was particularly infected, as in the majority of cases the thread itself was produced by small craftsmen under very poor conditions of hygiene; in actual fact, however, the quantitative content of resistant bacteria spores in the thread is more or less immaterial — within certain limits — as long as the ideal cannot be attained: the completely sterile, unimpaired gut as the initial material.

The nature of the bacteria and spores to be found in catgut has been examined by several workers, who have shown that they include microbes originating in the intestine as well as bacteria and spores conveyed during the process of manufacturing the thread. *Brunner's* »catgut bacillus« (1890) seems to be identical with *Globig's* *Bac. globigii* or *Bac. mesentericus ruber*, described two years earlier (1888). Under certain conditions this bacillus produces highly resistant spores, which may be the reason why it has been found by many subsequent workers (*Braatz*, 1891, *Binnely*, 1904, *Johnson*, 1905, and many others). *Lauenstein* (1895) demonstrated the presence of *Micrococcus tetragenus* and *Bac. subtilis* as well as an unidentified rod. The development of anaerobic methods in recent years has led to the discovery of many other anaerobic bacteria; *Mackie* (1928) found *Tetanus*, *Knorr* (1931) demonstrated numerous anaerobes, including pathogenic varieties (such as gas gangrene, pararausch gangrene, *Bac. putrificus*, *Novy's* bacillus, *Bac. amylobacter*). *Clock* (1938) also proved the multifarious nature of the flora; in fifteen packets of »sterile« catgut he found 35 different spore-producing kinds of bacteria which he isolated and identified; five of them were anaerobic. Identification of the various bacteria may be a matter of minor importance, for, as several authors point out, one cannot be sure that there are no resistant pathogenic spores present if on the whole the material contains viable microbes.

As a consequence, the sterilization process has aimed at the complete eradication of germinative spores in the catgut or the raw material used in its manufacture.

The methods employed are many, some of them based on chemical action on the microbes in the material, others on the application of heat in some form or other, and others again on a combination of the two.

Endeavours to solve the problem of sterilization have constantly aimed at finding the strongest possible means of killing the spores. Numbers of chemical disinfectants have been employed since *Lister* (1869) made his carbol-catgut. Sublimate was also used towards the end of last century, and periodide of mercury from then on

for a long time. Chromic acid was used by *Lister* and is still in use. Silver compounds, also, were employed from about the beginning of the century in the disinfecting of catgut. Oil of juniper, oil of turpentine and other etheric oils have also been employed. For thirty years formalin was a favourite catgut disinfectant and it is still used in many surgical departments sterilizing their own ligature material.

Iodine was first used for catgut sterilization by *Jacobi* (1897); but it was *Claudius* (1906) who paved the way for the adoption of the aqueous solution of iodine, an extremely simple process that has earned much praise and has been widely used all over the world. *Bulloch* too sponsors it, though he draws attention to the loss of strength if the gut is allowed to lie in the solution too long. Chlorine and bromine compounds have also been employed in catgut manufacturing, as well as hydrogen peroxide and aniline dyes and numbers of other chemicals unnecessary to mention here.

Heat sterilization originally proceeded with the aid of hot air. *Reverdin* (1888) and many authors after him recommend the method, but more often the process has consisted of heating the dried catgut in an anhydrous fluid which might either be without bactericidal effect in itself, so that it was a purely heat treatment, or with bactericidal properties acting together with heat. The chemicals used were ethylalcohol, which when cold does not kill spores, sometimes in the form of alcohol vapour, as well as methyl, propyl, isobutyl and amyl alcohol, ether, chloroform, acetone, benzene, toluol, xylol and cumol; oils and oily liquids have been used for heating, for instance olive oil, almond oil, petrolatum liquidum, or mixtures of these fluids.

All these sterilization methods and means have been thoroughly tested and modified by many workers. The various methods have given greatly different results in the hands of different workers, partly owing to the heterogeneous nature of the material and its varying content of resistant spores, and partly as a result of the technique employed in control cultivation having in many cases proved to be too defective, especially as regards the removal of chemicals prior to cultivation for the purpose of inhibiting their bacteriostatic effect.

One can form an opinion of the sterility of commercial catgut today by referring to recent investigations. *Konrich & Zeissler* (1933) found that 80.7 per cent. of the material they tested was unsterile, *Cloch* (1935) found 46.5 per cent. unsterile, *Brewer* (1937) 43 per cent. and *Christensen & Marcussen* (1941) 62.3 per cent. unsterile. These are values of astonishing magnitude, suggesting a serious defect in the effectiveness of the sterilization processes.

One of the best control results is given by *Brewer's* investigations on a catgut material consisting of various factory preparations known to have been heat-sterilized by the *McLency & Chatfield* or other similar method; in this case 12.5 per cent. of the material was unsterile, despite the fact that this is considered to be the ideal method of heat sterilization.

In most cases the stage of manufacture at which sterilization has been essayed is after the gut has been twisted. *A priori* there is something particularly repugnant in the practice of twisting the spores inside the thread before sterilization, as the firmly-spun dried string will doubtless provide a great measure of protection to them. *Orskov's* experiments (1925) may to some extent be cited as a parallel, for they showed that paratyphoid bacilli enveloped in proteins of dessicated milk are particularly well protected from heat.

As to the sterilization of the thread it was already pointed out by *Rayevski* (1897) that sterility is obtained best if the gut material is treated prior to being twisted. This has been affirmed by later workers, especially *Kuhn* (1907), who was very zealous in his efforts to get sterilization introduced at an early stage of the manufacturing process, but without much success, probably because intestines in the fresh state are even more sensitive to chemical and heat influences than dried threads and are therefore very liable to change in a physical sense.

Accordingly, it is beyond all doubt that both under chemical treatment and under heat treatment the twisted, dried string of gut provides great protection to the spores and bacteria rolled into it. The ideal time for applying the sterilization process is prior to twisting, when the soaked spores are easily accessible and practically lying on the surface of the material. A certain admission of this lies perhaps in the so-called pre-sterilization practised by many makers of catgut, though it is often little effective and completely ignored in the later stages of treatment.

With regard to the question of spore killing itself, it is a well-known fact that under certain conditions spores may acquire a very high power of resistance. The present author has for instance worked with spores whose resistance to 1 per cent. iodine in a $1\frac{1}{2}$ per cent. aqueous solution of iodine of potassium is 313 hours.

It is also generally known that spore resistance falls very quickly when the spore begins to germinate, *i. e.* when the microbe is in the vegetative phase; this was already pointed out by Tyndall (1877) in his remarkable note to the Royal Society of Medicine, in which he described the principle of fractionated sterilization which afterwards came so much into use. Tyndallization, by the way, was later misused as a term for fractionated heating of *e. g.* catgut without leaving any chance for germination between the heatings, the chief element of the Tyndallization principle.

Catgut material, the gut in fresh condition, in itself offers no possibility of spore germination, no more than the twisted string does. But there is nothing to prevent the gut with its microbes from being placed in such conditions that the microbes find themselves in an environment that is favourable to germination. This simple fact is utilized in the present method sterilization the principles of which are the following:

I: *Sterilization proceeds in the freshly softened and scraped splitted guts (ribbons) prior to twisting.*

II: *The sterilization process is directed against the microbes in the vegetative phase, as prior to the actual sterilization the material is placed under suitable conditions for cultivation for a period so long that all the spores contained in it, anaerobic as well as aerobic, germinate without the forming of new resistant spores.*

III: *The further handling of the guts after sterilization proceeds under the observation of simple aseptic precautions in suitable rooms before their being subjected to a mild after-sterilization.*

When using this sterilization process there is no need to aim at the killing of resistant spores, but only of microbes in the vegetative phase. Consequently, complete sterility is obtainable by means of a treatment so mild that the material suffers no injury.

The author's studies of spore germination have shown that spores not injured by strong heat or by chemicals germinate very rapidly, and that all spores in a culture germinate

together, as was also demonstrated by *Magoon* (1926), so that by means of one cultivation under proper conditions it is possible to induce the germination of all the spores in the material within a few hours — and with this a very considerable reduction of the material's maximum microbe resistance for instance to iodine, which has proved to be a very good sterilizer in the method described.

In experiments with very large quantities of resistant spores it has been found that the resistance of microbes to 1 per cent. iodine in a $1\frac{1}{2}$ per cent. aqueous solution of iodine of potassium can be reduced to $\frac{1}{500}$ th or lower of the original resistance of the spores if it was very high. Subsequent to the maximum reduction there is a slow rise in the resistance when cultivation is protracted, as shown in the following experiment with soil spores; at the same time the bacilli are more granulated and they begin to form new spores.

A report on these experiments will be published later. Below I shall show how certain experimental series — partly of a theoretical character, partly with the sterilization of sheep guts — turned out.

For the purpose of ascertaining how the reduction of resistance in a soil-spore culture proceeds during cultivation for varying periods, an experiment was made with a suspension of soil spores prepared from a thirteen month's old pure culture from an agar surface. The agar was in a very advanced state of dessication. The suspension was prepared by washing the medium with sterile water, which produced a very dense suspension of spores. It was centrifuged, and the spores were washed twice in order to remove traces of agar. After washing the spores were suspended in water. This suspension was filtered three times through the same cotton-wool filter. Finally it was diluted, whereby the suspension contained about 250 millions of spores per c. c.

For the purpose of the experiment, which was performed in triplicate, freshly prepared spore suspension was absorbed into sterile pieces of filter paper with a calculated absorption capacity of $\frac{1}{10}$ c. c., which thus meant about 25 millions of spores to each piece of paper. A suitable number of freshly prepared pieces of filter paper with spores were placed by means of sterile tweezers into 15 sterile, warmed Petri dishes, whereafter they were completely covered with warm veal broth with pH 8.2. The dishes then stood in a thermostat at 37.5° for 2, 4, 6, 8 and 10 hours respectively. After each of these periods three dishes were taken out and their contents dealt with in an exactly uniform manner. The papers were removed from the medium, washed in sterile water and then transferred to a dish containing 1 per cent. iodine in a 1½ per cent. sterile aqueous solution of iodine of potassium. From there a piece of paper was transferred every hour to a tube containing sodium thiosulphate 10 per cent. + sodium carbonate 1 per cent. in water with a view to neutralizing the iodine content. Fifteen transfers were made in each experiment. The material was then transferred to tubes containing sterile water. All tubes before were sterilized by autoclaving at 121° for 45 minutes.

From the water the paper was transferred to tubes of broth with pH 8.2 for control cultivation, which extended over a period of 14 days at 37.5°.

Simultaneously with this experiment the resistance of the unchanged spores was determined in the same iodine solution. In this case the strips of paper, after absorbing the spore suspension, were washed in sterile water and laid in sterile dishes with the iodine solution. From this three strips were taken every sixth hour, 24 times in all, and treated in the manner already described.

The control experiment showed that under the given conditions the soil spore had an iodine resistance of 90—96 hours.

One of the three experiments is shown in *Table I*, growth in the control tubes being indicated by +.

Table I.

Cultivation in hours	Iodine treatment in hours														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0
4	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0

Table II shows the collective results of all three experiments.

Table II.

Cultivation in hours	Iodine resistance in hours		
	Exper. I	Exper. II	Exper. III
2	11	11	12
4	5	5	5
6	8	6	7
8	9	9	8
10	10	9	10

In this experiment there was a very rapid reduction of the resistance, it being greatly lowered even after two hours cultivation and reaching its maximum reduction (to about $\frac{1}{20}$ th) after four hours. Thereafter the resistance increased slowly with prolonged cultivation. The three experiments display very close mutual agreement.

In experimenting on gut sterilization the material employed was Russian salted guts treated by the ordinary methods usual in the manufacture of catgut until the ribbons after splitting were attached to loops of string, i. e. it had gone through the »unsterile« processes. The material was then cultivated, first under anaerobic, then under aerobic conditions.

In the laboratory experiments the method of cultivation employed was as follows: In loose rolls the lengths of gut were placed in culture tubes with broth, the entire material with its strings being completely covered by the substrate. When lowering the material into the tube great care was taken that neither gut nor the long tweezers used for transferring it touched the side of the tube above the broth in order to avoid leaving spores there without a chance of germinating.

The culture tubes were Pyrex test-tubes 3×15.5 cm.. The tubes were dry-sterilized for three hours at 160° before the broth was filled into them in a sterile way; they were then placed into the thermostat for control, afterwards into the refrigerator until required. Immediately after use the pH of the broth was checked and the culture tubes Koch'ed for three minutes in order to force the oxygen out of the broth. Immediately after being Koch'ed the tubes were cooled down to 40° in a water-bath and kept at that temperature until cultivation could begin.

The substrate employed in these experiments was a liver broth with a pH of 8.2.

After being prepared in the manner described the tubes were placed into a pre-heated Zeissler jar, which was then very carefully vacuumed by means of an oil-pump. During this process it was necessary repeatedly to fill the jar with carbon dioxide to prevent the guts in the tubes from being sucked upwards.

After cultivation under anaerobic conditions the Zeissler jar was opened, the tubes taken out and then, after a very careful shaking, placed under aerobic conditions, all at 37.5° but for varying times.

When cultivation was at an end there was visible growth in the tubes in most cases except where the period of cultivation was very short; the growth increased rapidly with the period, and direct microscopy revealed only sporeless rods, though after some of the longest cultivations a few tubes contained spore-like elements, and a few cocci.

Thereafter each separate length of gut, after being washed

with sterile water, was lifted with sterile tweezers and by means of a wide-stemmed funnel transferred to a conical 500 c. c. flask containing 1 per cent. iodine in a 1½ per cent. aqueous solution of potassium. The funnel was employed in order to prevent the deposition of bacteria over the iodine contents of the flask. The iodine solution was prepared sterile in a 5 litre flask and then poured sterile into the smaller flasks which had already been autoclaved at 121° for 45 minutes.

The guts treated for various periods in the iodine solution were transferred with sterile tweezers to a second 500 c. c. flask containing sodium thiosulphate 10 per cent. + sodium carbonate 1 per cent. in water. This flask with content was autoclaved as just mentioned.

The neutralization process in the thiosulphate solution extended over about 24 hours. The gut was then transferred to a third flask containing 500 c. c. sterile water to soak for about 24 hours, and then again to a culture tube with freshly Koch'ed broth for control cultivation, whereafter in a vacuumed Zeissler jar it remained in the thermostat at 37.5° for fourteen days. At the expiry of this period the tubes were taken from the jar and the result read, whereafter cultivation proceeded under aerobic conditions for fourteen days before the final result was read.

In this series the period of cultivation was varied for the anaerobic cultivation, whereas the aerobic period was kept constant at 2 hours. At least 16 tubes containing gut were used for each period, 8 of them containing the so-called right ribbons for making threads of about No. 0, and 8 containing the »left« ribbons for No. 4 threads. The length of the ribbons was 2.65 m.

After cultivation the duration of the sterilization process was varied, a right and a left ribbon being transferred into the sterilization fluid at each of 8 time intervals, or even more.

The moment of transfer was chosen according to orientating experiments within suitable periods, so that it could

be assumed that about the last three or four control tubes would be without growth.

One section of the experimental series has the appearance shown in *Table III*.

Table III.

	Cultivation in hours		Treatment in hours with			Control cul- tiv. 14 days		Microskopy
	anae- rob.	aerob.	Iodine	Thio- sul- phate	water	anae- rob.	aerob.	
Left ribbons	1	2	4	24	24	+		Bacilli + spores
	—	—	6	—	—	+		do.
	—	—	8	—	—	+		do.
	—	—	10	—	—	+		do.
	—	—	12	—	—	0	0	
	—	—	14	—	—	0	0	
	—	—	16	—	—	0	0	
	—	—	18	—	—	0	0	
	—	—	20	—	—	0	0	
	—	—	22	—	—	0	0	
	—	—	24	—	—	0	0	
Right ribbons	—	—	4	—	—	+		do.
	—	—	6	—	—	+		do.
	—	—	8	—	—	0	0	
	—	—	10	—	—	+		do.
	—	—	12	—	—	0	0	
	—	—	14	—	—	0	0	
	—	—	16	—	—	0	0	
	—	—	18	—	—	0	0	
	—	—	20	—	—	0	0	
	—	—	22	—	—	0	0	
	—	—	24	—	—	0	0	

The guts employed in this experiment contained no highly resistant spores, for without previous cultivation they were sterilizable in iodine in 84 hours, but not in 78 hours, a period at which the strength of the thread is already being affected. It should be observed here that there is a great difference in the content of resistant spores in the various lengths

Table IV.

Cultivation in hours		Iodine Sterilization time in hours		Control
anaerob.	aerob.	r. ribbons	l. ribbons	
1	2	10—12	10—12	78—84 hours
3	—	14—16	10—12	
5	—	18—20	10—12	
7	—	20—22	12—14	
9	—	22—24	14—16	72—78 hours
11	—	20—22	18—20	
13	—	18—20	16—18	
15	—	22—24	22—24	
17	—	22—24	14—16	72—78 hours
19	—	26—28	24—26	
21	—	26—28	18—20	

of gut, and consequently there are gaps in the control experiments, especially as regards the thin »right« ribbons.

The experiment shows that the microbes in the material lose their original resistance to such a degree through this short cultivation that the ribbons are certainly sterile after being under the influence of iodine for a period of only 10 or 12 hours, in which period the physical properties of the gut are not changed.

Table IV shows that optimal conditions are reached with a very short period of cultivation, 1 hour anaerobically + 2

hours aerobically. Orientating experiments showed that with still shorter cultivation the resistance is not reduced very much, which indeed could not be expected after the author's theoretical experiments. The experiment shows that for ribbons intended for thin threads the period of sterilization averages a little shorter than for the others. This circumstance recurs in other experiments and may possibly be explained by the fact that the iodine is slower in penetrating the thick knots caused by tying the thicker ribbons to the loops of string.

By means of experiments according to the principle here described it has been possible to determine optimal conditions with regard to periods of cultivation and temperature, to find suitable cultivation media, and to determine the pH most suitable for cultivation.

In practice 100,000 metres of sheep guts have been sterilized according to this principle and not a single germinative microbe was observed in any control sample. The catgut manufactured from the material (Novo catgut) has proved to be sterile in all sterility tests (made on 1½ per cent. of the finished catgut).

Summary.

The author describes a method of sterilization specially intended for the manufacture of catgut. The principles of the method are:

I: The method is applied to freshly soaked and scraped splitted guts (ribbons) prior to twisting.

II: The sterilization process is directed against the microbes in the vegetative phase, the material prior to actual sterilization being placed under suitable conditions for cultivation for a period so long that all spores present, anaerobic

and aerobic, germinate, but without new resistant spores being formed.

III: The further handling of the guts after sterilization proceeds under the observation of simple aseptic precautions in suitable rooms prior to a mild after-sterilization.

When employing this process it is unnecessary to aim at killing resistant spores, but only microbes in the vegetative phase. Consequently, complete sterility can be obtained by employing a treatment so mild that the material suffers no injury.

A description is given of experiments on the altered resistance of a spore culture during the growth, tested on an aqueous iodine solution, and an experimental series on the sterilization of gut material according to the principles of the method.

BIBLIOGRAPHY.

1. *Binney, H.*: Boston Med. Surg. J., 150, 504, 1904.
2. *Braatz, E.*: Beitr. klin. Chir., 7, 70, 1896.
3. *Brewer, J. H.*: J. A. M. A., 108, 722, 1937.
4. *Brunner, C.*: Beitr. klin. Chir., 6, 98, 1890.
5. *Bulloch, W., Lampitt, L. H. & Bushill, J. H.*: Med. Res. Couns., Spec. Rep. Ser., Nr. 138, 1929.
6. *Christensen, H. M. & Marcussen, P. V.*: to be published in Acta path. et microb. Scand.
7. *Claudius, M.*: Undersogelser over Jodcatgut, Kobenhavn 1906.
8. *Clock, R. O.*: Surg. Gyn. Obst., 66, 878, 1938.
9. *Globig, Z.*: Hyg., 3, 322, 1888.
10. *Johnson, F. W.*: Boston Med. Surg. J., 152, 161, 1905.
11. *Knorr, M. J.*: Münch. med. Wchschr., 77, 514, 1930.
12. *Konrich, F. & Zeissler*: Arch. f. klin. Chir., 177, 742, 1933.
13. *Kuhn, F.*: Münch. med. Wchschr., 54, 2483, 1907.
14. *Lausten, C.*: Arch. f. klin. Chir., 50, 323, 1895.
15. *Lister, J.*: Lancet, I, 451, 1869.
16. *Mackie, T. J.*: Edinburgh 1928. An inquiry into post-operative Tetanus. A Rep. to the Scot. Board of Health.

17. Magoon, C. A.: J. Bact., 11, 253, 1926.
18. Rayevski, P. A.: Khirurgiya, 1, 467, 1897 (cited by Bulloch).
19. Reverdin, A.: Rev. med. Suisse rom., 8, 348, 1888.
20. Tyndall, J.: Proc. Roy. Soc., 25, 569, 1877.
21. Ørskov, S. L.: Compt. rend. Soc. de biol., 92, 1323, 1925.

DIAGNOSTIC ANTIPNEUMOCOCCAL SERA PRODUCED BY IMMUNIZATION WITH ONE OR MORE TYPES OF THE PNEUMOCOCCUS.

By *Erna Morch.*

(Received for publication January 10th, 1942).

In recent years, a great many types of pneumococcus have been established. In 1921—32 Cooper and collaborators divided the pneumococci into Types 1—32. Subsequently other authors have reported new types of pneumococcus (Silberstein; Finland & Brown; Vammen; Walter; Kauffmann, Morch & Schmith; Walter and collaborators; Morch), so that now 68 types have been set up. Owing to this highly developed differentiation, the production of serviceable diagnostic antipneumococcal sera has become an important task.

In 1935 Cooper & Walter reported their studies on diagnostic antipneumococcal sera. Rabbit sera were preferable to the horse sera employed previously, because the former showed greater specificity. The minimum requirement of a diagnostic serum was an agglutination titer of 1:200. Sera produced for diagnostic use were examined for cross-reactions, and these properties were eliminated by absorption. In 1938 Walter presented her further experiences in this field. The potency of diagnostic sera was determined both as capsular swelling titer and agglutination titer. As a minimum requirement for each type in a pooled serum the capsular titer was set at 1:15.

In the same year, 1938, Kauffmann, Bjorneboe & Vammen gave an account of the production of rabbit antipneumococcal serum, including studies on capsular and agglutinative titers, together with cross-reactions, for sera of Types 1—32. Welch, Borman & Mickle (1939) likewise determined cross-reactions for sera of all the types 1—32; the diagnostic sera were made specific by absorption. In 1939 Robinson stated that the National Institute

of Health (Boston, Mass.), as a minimum requirement, insisted on a capsular titer of 1:16 for monovalent diagnostic sera, and 1:8 for pooled sera. Peritoneal exudate of mice was used for determination of the capsular titer. As the diagnostic sera were employed for the Neufeld reaction, it was most reasonable to give their potency in capsular swelling titer, not in agglutination titer. In the pooled sera the types were distributed after their frequency; and as this frequency was subject to variation, the composition of these sera had to be revised now and then.

Lyall & Odell (1939) carried out some extensive studies on diagnostic antipneumococcal sera. They emphasized that each portion of serum that was to be employed for diagnostic purposes had first to be examined for cross-reactions, as such reactions did not occur regularly in all sera of the same type. Pooled sera were composed so that the types showing mutual reactions were employed together.

The great increase in the number of the pneumococcus types has brought about some radical changes in the diagnostic sera employed. Some of the new types set up were found to react with several of the diagnostic sera employed previously. Hence these sera had to be made specific by absorption, but this process reduced also the capsular titer of the serum for the homologous type. On further addition of new types to the system the diagnostic sera were gradually absorbed to such an extent as to become unserviceable for diagnostic purposes in certain cases. It was necessary, therefore, to obtain suitable diagnostic sera by employment of new methods. In the following an account will be given of the production and employment of the diagnostic antipneumococcal sera now being used in the State Serum Institute.

A. GENERAL ASPECTS.

1. *Vaccine.*

In 1938 Kauffmann, Bjørneboe and Vammen gave a comprehensive account of the production of pneumococcus vaccine. As the method has since been modified in some respects, it will here be mentioned briefly:

The strains employed for the preparation of vaccine are examined for cross-reactions, in order — as far as possible, beforehand — to make sure of the identity of the type. After the production of the serum, the final type diagnosis is made by cross-absorption with a known pneumococcus strain. All the cultures have passed through several mice before they are used for the production of vaccine.

In the forenoon a mouse is given an intraperitoneal injection of 0.5 cc. of an 18—20-hour serum broth culture. When the mouse is distinctly ill, it is killed. Cultures are made from the heart's blood on a blood agar plate for control of the purity of the culture and in ox-heart broth — in a quantity sufficient for the inoculation. As a rule, 24—30 liters of ox-heart broth are inoculated for each type (8—10 flasks of 3 liters). As a preliminary measure the ox-heart broth flasks are placed in incubator at 37° C. on the day before the inoculation and left there for 24 hours; this gives at the same time a control of their sterility. In the morning each 3-liter flask is inoculated with 20 cc. of the culture. In order to promote the growth, 2 % of a sterile rabbit blood solution is added (defibrinated rabbit blood diluted with distilled water (1:10) and filtered). The flasks are then incubated again at 37°, and the growth is followed by taking a sample of the culture now and then (5—10 cc. in a test tube). The density of the growth in the sample is estimated, and the capsule formation is tested by a Neufeld reaction with the homologous serum. Particular attention has to be paid to the cultures of Types 3 and 37, as the capsules of these types degenerate very rapidly. On this account it may be necessary to interrupt the growth before it becomes maximal. The »mucus« vaccine described by Kauffmann, Bjorneboe & Vammen is no longer employed; a Type 3 vaccine is produced similarly to the other pneumococcus vaccines. From most of the other types the capsules are found to be well preserved when their optimal density is reached after 4—7 hours' growth.

The growth is interrupted by addition of 2 % formalin, after subcultures on blood agar plates have been made from each flask for the sake of control of the purity. The flasks remain in the incubator at 37° till the following morning, when the cultures are centrifuged in a high-speed milk separator. The resulting sediment is ground in a mortar and suspended in the Sorensen buffer solution (20 cc. KH_2PO_4 m/15 + 80 cc. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ m/15 + 300 cc. 0.9 % NaCl solution), and 1 % formalin is added. The density of the finished vaccine is estimated by means of a standard containing 1000—2000 million pneumococci per cc.; this density is

designated as Standard 1. The vaccines are stored in suspensions that are 10—20 times denser than Standard 1.

The vaccine is controlled for capsular swelling with the homologous serum, and a smear is stained after Gram's method. In a successful vaccine all the bacteria are Gram-positive. If a greater part of the pneumococci are Gram-negative, the vaccine has undergone too much autolysis and is unserviceable. For immunization the vaccine is used most often with a density as Standard 1, containing 0.2 % formalin.

When stored in dense suspensions in ice-box, these vaccines have been found to preserve their capacity for capsular swelling and agglutination through several years. Exceptions to this rule, however, are the vaccines of Types 3 and 37, which have to be renewed not infrequently.

2. Immunization.

a) Immunization with One Type.

White rabbits, bred in the institute, are used for the immunization; their weight has been 2—3 kg. The vaccine employed has been exclusively formalin vaccine of a density as Standard 1. Prior to the injection the vaccine is heated to 37°; it is injected slowly into the rabbits, intravenously. The usual procedure is to give the animals 3 injections a week (on Monday, Wednesday and Friday, or on Tuesday, Thursday and Saturday). The dosage may be set schematically as follows:

1' week:	0.25	—	0.5	—	0.5 cc., Standard 1	
2' »	1.0	—	1.0	—	1.0 »	»
3' »	1.5	—	1.5	—	1.5 »	»
4' »	2.0	—	2.0	—	2.0 »	»
5' »	2.0	—	2.0	—	2.0 »	» , and so on.

If the animals can stand it, the dose may be increased further. As a rule, however, the maximal dose is 2 cc. per injection. It is not practicable to establish a dosage scheme of general validity, as allowance has to be made for the varying sensitiveness of the individual animals. Besides, the vaccine may have a more or less toxic effect.

After immunization for 5—6 weeks a sample of blood is taken for estimation of the potency of the serum. As the various animals do not form the same amounts of antibody, the sera of 3 animals are pooled in order to get a more reliable impression of the degree of immunity obtained in the group of animals than may be had from the examination of one animal. If the pooled serum is found to possess a sufficiently high titer, the animals are bled by heart puncture 5—6 days after the last injection of vaccine. About 50 cc. of blood is taken from each rabbit. This operation proves fatal to 5—10 % of the animals. A couple of days after the heart puncture the immunization is resumed, and 3—4 weeks later the heart puncture is repeated. When the immunization period is more protracted, the injections of vaccine may be reduced to twice a week (Monday and Thursday; Tuesday and Friday; or Wednesday and Saturday). At the conclusion of the immunization the animals are bled dry.

b) *Immunization with Several Types.*

It is possible by immunization of rabbits with a vaccine mixture to produce sera that react with several types. A serum that is to be used, for instance, for diagnosis of the 7-group (Types 7, 7A, 7B and 7C) may be obtained by immunization with a vaccine containing equal parts of vaccine of Types 7, 7A, 7B and 7C. At the commencement of the immunization the density of this pooled vaccine corresponds to Standard 1; later the density is increased to Standard 2 — i. e., twice the density of Standard 1. The dosage for such immunization may be set schematically as follows:

1' week:	0.25	—	0.50	—	0.50 cc.,	Standard 1
2" "	1.0	—	1.0	—	1.0	" "
3" "	1.5	—	1.5	—	1.5	" "
4" "	2.0	—	2.0	—	2.0	" "
5' "	1.0	—	1.0	—	1.0	" Standard 2
6' "	1.5	—	1.5	—	1.5	" "
7' "	2.0	—	2.0	—	2.0	" "
8' "	2.0	—	2.0	—	2.0	" " , and so on.

A dose larger than 2 cc. of Standard 2 is tolerated but seldom, and often it is necessary to lower this dose somewhat if the animals are affected too much by the treatment. Although the animals in this way receive a smaller amount of vaccine of each type than when the immunization is carried out with one type, as a rule the resulting sera will be just as potent. As far as the potency of the obtained serum is concerned, it appears to be of minor importance whether or not the types employed in the vaccine mixture are near related. Immunization with up to 5 types simultaneously has given such as high titers for the individual types as is otherwise obtained for a serum produced with one type. Often it takes immunization for 8—10 weeks before the agglutination titer and, especially, the capsular swelling titer reach their maximum. It is to be recommended, therefore, not to employ too young sera for diagnostic purposes.

As to the capsular titers obtained for the various group sera produced by immunization with several types, see Table 3.

3. Examination and Treatment of Rabbit Immune Sera.

The blood from the rabbits (obtained by heart puncture or complete bleeding) is left standing in ice-box for 24 hours. The serum is poured off and centrifuged, then filtered, whereafter 0.5 % phenol (10 % of a 5 % phenol solution) is added under constant shaking. Such a serum can keep sterile for years, and its antibody content remains unchanged or is lowered but insignificantly. The serum employed for diagnostic purposes is not subjected to the same processes of purification as is the serum for therapeutic use.

The first examination of the serum is determination of its capsular and agglutination titers.

The term «capsular titer» signifies the reciprocal value of the greatest serum dilution able to give a distinct capsular swelling of practically all the bacteria. Indistinct capsular swelling or capsular swelling of only a few bacteria is not taken into account.

Correspondingly, »agglutination titer« signifies the reciprocal value of the greatest serum dilution able to give a macroscopic flocculation.

The capsular and agglutination titers are determined at the same time. The titration of the serum dilutions is carried out in Widal tubes, commencing with undiluted serum or with serum dilution 1:10, each tube containing 0.2 cc. A control test for self-agglutination of the vaccine is made in a tube with 0.2 cc. of physiological salt solution. The serum dilutions are 1:1, 1:2, 1:4, and so on; or 1:10, 1:20, 1:40, and so on. To each tube, also the control, is added 0.2 cc. of pneumococcus vaccine of a standardized density. After the addition of the vaccine, the serum concentration in the first tube is 1:2 (1:20), in the second tube 1:4 (1:40), and so on. Thus, a titer, for instance, of 40 means that there is a reaction in the first two tubes when the start is made with the serum dilution 1:10.

The vaccine standard for these titrations is a pneumococcus suspension containing about 100 million pneumococci per cc. The dilute vaccines are prepared once a month by dilution of the dense vaccines (10—20 times the density of Standard 1). The dilution is made with physiological salt solution, to which 0.5 % formalin is added. It has been found that the capacity of the vaccine for capsular swelling and agglutination is impaired by storage in a highly diluted state. The mixtures of serum dilution and vaccine are shaken vigorously. A loopful of the contents of each tube is examined under the microscope, and this determination reveals the highest dilution of serum giving a distinct capsular swelling. The tubes are then placed in water-bath at 50° C. for 20 hours, whereafter the agglutination is read.

On examination of a serum that reacts with several types, its capsular and agglutination titers have to be determined for each of the types concerned. Thus a 7-group serum is examined with Types 7, 7A, 7B and 7C.

A diagnostic serum must be absolutely specific, *i. e.*, reacting only with the one type it is produced for — or, if it is a group serum or a pooled serum, with the number of types it is adjusted to.

Each portion of serum that is to be employed for diagnostic purpose has to be examined for cross-reactions. This is done by means of Neufeld tests with all the pneumococcus types known. This determination is carried out with the same dilute standard vaccines as used for determination of

the capsular and agglutination titers. The degree of the reactions is titrated, and then the capacity for these reactions is eliminated by absorption.

The absorption is carried out with the dense formalin vaccines. When the degree of the cross-reactions is known, it is possible with some experience to estimate how much vaccine is required to remove a reaction of a certain degree. The vaccine is put into centrifuge tubes (about 5 cc.) that are centrifuged for 30 min. at a rate of 5000 revolutions per min. Now the vaccine is centrifuged so vigorously that the supernatant clear fluid can be poured off. The tube is filled a little more than halfway with the serum that is to be absorbed. The serum and the vaccine are mixed thoroughly by means of a Pasteur pipette. Previously, the tubes were placed at 37° C. for 10 min., or in ice-box overnight. According to Bjorneboe (1938), however, the absorption is completed within 5–10 minutes, irrespective of the temperature and serum concentration. Lately, therefore, the tubes have been left standing at room temperature for 10 minutes — with just as good results as before.

The mixtures of serum and vaccine are centrifuged for 30 min. at the same rate as before. The supernatant clear serum is pipetted off, and a control test is made to make sure of complete absorption by testing the serum for capsular swelling with the absorbent type. A cross-reaction with a capsular titer of 32–64 can be removed most often by one absorption. With higher titers the absorption has to be repeated, *i.e.*, after the first centrifuging the serum is mixed with an additional tube of centrifuged vaccine of the same type as before, and centrifuged once more. A control test is again made on the serum in order to ascertain the completeness of the absorption. If several reactions with low titers (2–8) have to be removed from the same serum, 2–3 different vaccines may be mixed in the centrifuge tubes, and thus the reactions with 2–3 types can be removed from the serum by one absorption.

Control tests for specificity are performed on the finished pooled sera by means of Neufeld reactions with all the pneumococcus types. The serum must give reactions only with the types included in the pool.

After filtration of the sera methylene blue is added to the absorbed sera (0.2 cc. of a 2 % methylene blue solution to 15 cc. of serum). At last the capsular titers are determined. It is the general experience that absorbed sera decrease in potency more rapidly than non-absorbed, and hence it is

necessary at intervals of a few months to make control tests for capsular titer on the diagnostic sera, nearly all of which are absorbed.

B. SPECIAL FEATURES.

Four kinds of antipneumococcus serum are employed for diagnostic purposes, namely: a) *Pooled sera*, reacting with several different types; b) *group-sera*, reacting with all the types within one group; c) *single sera* or monovalent sera, reacting with a single type; and d) the so-called *factor sera*, absorbed sera employed for differential diagnosis within a group.

These various sera are produced by immunization of rabbits with a vaccine of one pneumococcus type or with a vaccine mixture consisting of several types.

1. Monovalent Sera.

Here the term »monovalent pneumococcus serum« means a serum that reacts only with one type. These sera are obtained by immunization with one pneumococcus type. Some of the immune sera produced in this way have no cross-reactions and are thus suitable for diagnostic use without further treatment. Other sera present some heterologous reactions that have to be removed by absorption, before they are serviceable for diagnostic use. The sera employed for the diagnosis of the individual types are such monovalent sera produced by immunization with one type and removal of the heterologous reactions by absorption. Monovalent sera are used for the diagnosis of all the pneumococcus types that do not belong to any group, namely the following 26 types: 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 25, 27, 28, 29, 31, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41 and 42.

2. *Polyvalent Sera.*

Here a »polyvalent pneumococcus serum« means a serum reacting with several types. Such a serum may be produced by a) pooling monovalent sera, b) immunization with several types, or c) pooling sera obtained by immunization with several types.

a) *Pooling Monovalent Sera.*

The pooled sera employed for diagnosis are polyvalent, giving capsular swelling with several pneumococcus types. The pooled sera employed hitherto have been obtained by mixing a number of monovalent sera. Such a pooled serum is prepared in this way: Firstly sera are produced corresponding to each type that is to enter into the pool. Then these single sera are absorbed for the heterologous reactions and mixed together. The pooled serum is tested for specificity, and its capsular titers are determined.

If we were to continue the preparation of pooled sera in the way here described to cover all the 68 pneumococcus types established so far, and we were to limit ourselves, say, to the employment of 8 such sera, each pool would have to consist of 8—9 types. Obviously, the single sera entering into these pools would thus be diluted rather considerably. Attempts have been made, therefore, to produce pooled sera in a new way that will be described below.

At first the diagnosis of the pneumococcus types that are grouped together was made by the use of sera corresponding to the types first set up for the respective groups. For example, a serum produced by immunization with Type 7 (strain 7 1749/38) was used for the diagnosis of all the types belonging to 7-group (Types 7, 7A, 7B and 7C). Sera for all the types within a given group will react with all the types of the group; but the reaction with one or a few of these types may be so weak that such a serum is not suitable for diagnostic work. So, in order to obtain a serviceable diagnostic group serum, a pool was made of sera produced

by immunization with the individual types belonging to the group. Then the reactions heterologous for this group were removed by absorption.

b) *Immunization with Several Types.*

Simultaneous immunization with several antigens was tried by Hektoen & Boor (1931) who found rabbits able to form antibodies against many antigens introduced at the same time. For antigens these authors used various proteins. Even when 35 antigens were injected simultaneously, antibodies (precipitins) were formed for all of them except one. Boyd & Bernard (1937) also investigated simultaneous immunization with several antigens (different proteins); two rabbits that were immunized with 5 different antigens formed antibodies against all the antigens, but the amount of antibody was less than that which was obtained in two other rabbits immunized with a single antigen. Bjørneboe (1941) immunized rabbits with 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 8 pneumococcus types simultaneously. He found that the antibody production per type was the same for animals immunized with 1, 2 or 3 types, a little weaker with 4 or 5 types, and weakest with 6 or 8 types. This applied to the maximal amount of antibody as well as to the rapidity with which these amounts were formed. It was noticed that the rabbits were more able to stand immunization with several types than with a corresponding dose of vaccine of one type.

As mentioned, the polyvalent group and pooled sera may be obtained by pooling monovalent sera corresponding to the individual types making up the group or pool. In order to avoid the dilution brought about by the mixture, attempts have been made to produce these diagnostic sera by immunization with several types injected simultaneously.

Group sera are obtained by immunization with pooled vaccines containing equal parts of the types belonging to the group. The immune serum is freed from heterologous reactions by absorption, and the capsular titer is determined

for each type of the group. Diagnostic work is carried out by employment of polyvalent immune sera against the following 13 groups: 6, 7, 9, 10, 11, 15, 18, 19, 22, 23, 24, 32 and 33 (see Table 3).

For diagnosis of the 35-group it was found preferable to use a serum produced with strain 35 alone. Such a serum gives strong reactions with Types 35, 35A and 35B (Table 3). A 35-serum produced by immunization with the three types of the group will give so strong heterologous reactions, especially with Type 42, that the removal of these reactions will leave a serum that reacts with the types of the 35-group so weakly as to make it difficult to work with for diagnostic purposes.

c) Pooling Sera obtained by Immunization with Several Types.

The pooled sera employed hitherto in the State Serum Institute have been composed as follows (modification of the Lederle sera employed originally):

<i>Pool</i>	<i>Types or Groups</i>
A	1, 2, 7
B	3, 4, 5, 6, 8, 19
C	9, 12, 14, 15, 17
D	10, 11, 13, 20, 22, 31
E	16, 18, 21, 24, 28
F	23, 25, 27, 29, 32
G	33, 34, 35, 36, 37, 38
H	39, 40, 41, 42

It seemed desirable now to try whether the diagnostic pooled sera might be improved by using another combination of the types in the pools, and also by employing immunization with several types.

Like hitherto, the types are distributed on 8 pooled sera. Their distribution is planned primarily with a view to the cross-reactions, so that the types having strong mutual reactions are gathered in the same pool, and thus it is not necessary to remove these reactions. But, as the cross-reactions for several types have a very wide range, it has not

been practicable to compose these pooled sera so as to avoid all absorption.

Another consideration has been as far as possible to place the more common types in the first pools and to limit these pools to 5 types or groups, at the most. That one of the pools includes 7 types is due to the circumstance that Type 42 was not set up till the immunization for the production of these sera had been going on for about one month. Type 42, which is closely related to Type 35A, entered into the same pool as this type, and at that point of time it was impracticable to transfer any of the other types belonging to the pool. Vaccine of Type 42 was added to the pooled vaccines containing Type 35A, and the immunization was continued with this new mixture. Within a few weeks the titer obtained for Type 42 was just as high as that for the other types with which the animals had been immunized about one month longer. That this pool includes 7 types will give no particular difficulty in the diagnostic work, as these types are all rather infrequent.

Bjorneboe (1941) showed that on immunization with a fairly large number of types (6—8) there is a reduction in the amount of antibody formed per type. It was decided, therefore, to use two groups of rabbits for the production of each pooled serum, each group of rabbits being immunized with 4—5 types, and then pool the serum obtained from the groups. With the pneumococcus groups that include four types (7, 18, 19, 33) the immunization was carried on special groups of rabbits, so that the sera produced in this way could be incorporated in pooled sera and also be used as diagnostic group-sera and for therapeutic purposes. As Type 9A was set up after these experiments had been started, the 9-group, which now includes 4 types too, has not been treated like the above-mentioned larger groups.

Like the previous pooled sera, the new ones are designated by the capitals A-H. The two sets of rabbits whose serum enters into the pooled serum are designated by I and II. Thus pool serum A, which reacts with Types 1, 2, 4, 5 and

the 18-group, is obtained by combining the serum from rabbits A I (immunized with Types 1, 2, 4, 5) with serum from rabbits A II (immunized with Types 18, 18A, 18B and 18C). The composition of the pooled vaccines employed for the immunization of the various sets of rabbits has been as recorded in Table 1.

Table 1.

Distribution of the Pneumococcus Types over 46 Groups of Rabbits Immunized with 4-5 Types Simultaneously.

Designation of rabbit groups	Pneumococcus types included in the pooled vaccines
A I	1 + 2 + 4 + 5
A II	18 + 18 A + 18 B + 18 C
B I	3 + 6 A + 6 B + 8
B II	19 + 19 A + 19 B + 19 C
C I	7 + 7 A + 7 B + 7 C
C II	20 + 24 + 24 A + 31 + 40
D I	9 L + 9 N + 9 V + 36 + 37
D II	11 + 11 A + 11 B + 16
E I	10 + 10 A + 21 + 39
E II	33 + 33 A + 33 B + 33 C
F I	12 + 27 + 32 + 32 A
F II	17 + 22 + 22 A + 41
G I	13 + 25 + 34 + 38
G II	29 + 35 + 35 A + 35 B + 42
H I	14 + 15 + 15 A + 15 B
H II	23 + 23 A + 23 B + 28

Type 9A was established at a late point of time, and hence it has not been incorporated in the pooled vaccines here employed. Serologically, however, Type 9A is very closely related to Type 9V (cf. Table 5). So a serum reacting with Type 9V will also react with Type 9A.

The finished pooled sera A-H are then composed of the following types or groups:

<i>Pool</i>	<i>Types or Groups</i>
A	1, 2, 4, 5, 18
B	3, 6, 8, 19
C	7, 20, 24, 31, 40
D	9, 11, 16, 36, 37
E	10, 21, 33, 39
F	12, 17, 22, 27, 32, 41
G	13, 25, 29, 34, 35, 38, 42
H	14, 15, 23, 28

The diagnostic pneumococcus sera employed in and distributed by the State Serum Institute from January 1, 1942, are listed in Tables 2 and 3. The strains employed for the immunization are recorded, besides the capsular titers for the finished sera. It is to be mentioned that Type serum 29 reacts with Type 35B, as absorption with this type will remove so much of the antibody of serum 29 as to make it unserviceable for diagnostic use.

For the sake of space all the cross-reactions observed have not been recorded. Table 4 gives the cross-reactions observed for the pooled serum G — the reactions were demonstrated in group-sera G I and G II — and the types with which these sera are absorbed, so that the two sera, after pooling, could give a specific pooled serum G.

A few reactions were so weak (serum G I with Types 6B and 36, serum G II with Types 9L, 23A and 36) that they were absent after G I and G II had been absorbed and mixed. Reactions with the types represented in the pooled serum G were not removed (serum G I with Type 29, 35, 35A and 35B; serum G II with Type 34). Not infrequently the types employed for the absorption removed reactions for more than one type, owing to some antigens being common to several types. Thus the absorption of serum G I with type 10A removed reaction for Type 39 (antigen 10d) as well as for 10A; absorption with Type 11B removed reactions with Types 11 and 11B (antigen 11b) and absorption with Type 31 removed reactions with Types 20 and 31 (antigen 20b). In serum G II reactions with Types 11 and 11A were removed

Table 2.
Diagnostic Pneumococcus Sera. I.
Pooled Sera. January 1, 1942.

Pooled sera	Reaction with Types	Immunization with strains	Capsular titer in finished sera	Pooled sera	Reaction with Types	Immunization with strains	Capsular titer in finished sera
A	1	1 N	80	E	10	10 6118/39	80
	2	2 M 57	80		10 A	10 A 12270/38	320
	4	4 L	160		21	21 8026/39	40
	5	5 964/39	160		39	39 4971/39	160
	18	18 L	160		33	33 3077/37	160
	18 A	18 A 6343/39	160		33 A	33 A Hallarman	160
	18 B	18 B 2167/40	160		33 B	33 B Yarmishin	160
	18 C	18 C 7573/39	320		33 C	33 C Morgan	160
B	3	3 Nr. 2	32	F	12	12 L	80
	6 A	6 A AL	160		27	27 L	80
	6 B	6 B 753/39	160		32	32 Nr. 34375	160
	8	8 L	80		32 A	32 A 9309/39	320
	19	19 L	80		17	17 L	80
	19 A	19 A 977/39	80		22	22 L	80
	19 B	19 B 5928/39	80		22 A	22 A 4092/39	80
	19 C	19 C Oslo	80		41	41 Meyers	160
C	7	7 1749/38	320	G	13	13 L	80
	7 A	7 A 2040/37	320		25	25 L	40
	7 B	7 B 1348/39	160		34	34 20/37	80
	7 C	7 C 3623/39	320		38	38 1874/39	40
	20	20 4427/39	80		29	29 L	80
	24	24 L	80		35	35 361/39	160
	24 A	24 A 2748/39	80		35 A	35 A 1936/39	160
	31	31 L	40		35 B	35 B 4356/39	160
D	40	40 1662/40	160		42	42 7471/40	80
	9 A	÷	80	H	14	14 L + 14 2641/39	160
	9 L	9 L L	80		15	15 L	320
	9 N	9 N Nr. 34354	160		15 A	15 A 389/39	320
	9 V	9 V 9710/38	80		15 B	15 B 3449/39	320
	36	36 1095/39 + 2021/39	80		23	23 Mac	80
	37	37 7077/39	16		23 A	23 A 2584/39	160
	11	11 L	320		23 B	23 B 5349/39	160
	11 A	11 A 1813/39	320		28	28 L	160
	11 B	11 B 63/40	320				
	16	16 L	80				

L = strain received from Lederle Laboratories, New York.

Table 3.

Diagnostic Pneumococcus Sera. II.
Type and Group Sera. January 4, 1942.

Type or Group sera	Reaction with Types	Immunization with strains	Capsular titer in finished sera	Type or Group sera	Reaction with Types	Immunization with strains	Capsular titer in finished sera
1	1	1 924/39	1280		19	19 L	160
2	2	2 7986/39	160	19	19 A	19 A 977/39	160
3	3	3 1008/39	32		19 B	19 B 5928/39	160
4	5	4 L	320		19 C	19 C Oslo	160
5	6	5 L	80	20	20	20 4427/39	320
				21	21	21 L	160
6	6 A	6 A AL	160	22	22	22 L	320
	6 B	6 B 753/39	320		22 A	22 A 4092/39	320
	7	7 1749/38	320	23	23	23 Mac	160
	7 A	7 A 2040/37	160		23 A	23 A 2584/39	160
	7 B	7 B 1348/39	160		23 B	23 B 5349/39	160
	7 C	7 C 3623/39	160	24	24	24 L	80
8	8	8 L	640		24 A	24 A 2748/39	160
				25	25	25 L	160
9	9 A	9 A Wilder	640	27	27	27 L	320
	9 L	9 L L	640	28	28	28 L	160
	9 N	9 N Nr. 34354	640	29	29	29 L	320
	9 V	9 V 9710/38	640	31	31	31 L	160
10	10	10 6118/39	80	32	32	32 Nr. 34375	640
	10 A	10 A 12270/38	80		32 A	32 A 9309/39	640
	11	11 L	640	33	33	33 3077/37	160
11	11 A	11 A 1813/39	160		33 A	33 A Hallarman	320
	11 B	11 B 63/40	640		33 B	33 B Yarmishin	320
12	12	12 L	160		33 C	33 C Morgan	320
13	13	13 L	160	34	34	34 20/37	1280
14	14	14 L	160		35	35 Dickerson	320
	15	15 L	160	35	35 A		320
15	15 A	15 A 389/39	320		35 B		160
	15 B	15 B 3449/39	320	36	36	36 1095/39	320
16	16	16 L	80	37	37	37 1784/39	32
17	17	17 L	320	38	38	38 1874/39	32
	18	18 L	320	39	39	39 4971/39	160
18	18 A	18 A 6349/39	320	40	40	40 Colemore	320
	18 B	18 B 2167/40	320	41	41	41 Meyers	320
	18 C	18 C 7573/39	320	42	42	42 7471/40	32

L = strain received from Lederle Laboratories, New York.
 Acta path. Vol. XIX, IV

Table 4.

*Cross-Reactions of the Pooled Serum G and Absorptions
Performed for Their Removal.*

Pooled serum	Group-sera	Reaction with Types	Gross-reactions	Absorbed with Types
G	G I	13 25 34 38	6 B (< 2), 20 (< 2), 10 A (4), 11 (2), 11 B (2), 29 (4), 31 (8), 35 (8), 35 A (2), 35 B (4), 36 (< 2), 39 (4)	10 A, 11 B, 31
	G II	29 35 35 A 35 B 42	9 L (< 2), 10 (2), 11 (2), 11 A (8), 20 (256), 23 A (< 2), 31 (256), 33 A (128), 34 (4), 36 (2), 39 (8).	10, 11 A, 31, 39

The figures in parenthesis give the capsular titers.

by absorption with 11A (antigen 11e) and reactions with Types 20, 31 and 33A were removed with Type 31 (antigen 20b).

Thus the knowledge of the capsular antigens of the pneumococcus types has made the work with absorptions considerably easier. The experiments have confirmed the correctness of the formulae set up, as in every instance the results obtained could be explained in keeping with these formulae. The schema originally set up by Kauffmann, Mørch and Schmith on the capsular antigens of the pneumococcus types has later been extended by Mørch. This schema which now covers 68 known pneumococcus types is given in Table 5.

For illustration of the improved results obtainable by polyvalent immunization, the capsular titers for two diagnostic 23-sera are given in Table 6. One is produced by immunization with Type 23 (strain 23 Mac); this serum was formerly used for diagnosis of the three types of the 23-group: Types 23, 23A and 23B. The other serum is a group-serum 23 obtained by simultaneous immunization with the three

Table 5.

Schema of the Capsular Antigens of the Pneumococcus Group.
(After Kauffmann, Morch & Schmith.)

* = revised or new formula (Morch, 1942).

Type	Antigenic Formula	Type	Antigenic Formula
1	1 a	*19 A	19 a, 19 c, 19 d
2	2 a	*19 B	19 a, 19 c, 19 e, 7 h
3	3 a	*19 C	19 a, 19 c, 19 f, 7 h
4	4 a	20	20 a, 20 b, 7 g
5	5 a	21	21 a
6 A	6 a, 6 b	*22	22 a, 22 b
6 B	6 a, 6 c	*22 A	22 a, 22 c
7	7 a, 7 b	23	23 a, 23 b, 18 b
7 A	7 a, 7 b, 7 c	23 A	23 a, 23 c, 15 a
7 B	7 a, 7 d, 7 e, 7 h	*23 B	23 a, 23 b, 23 d
7 C	7 a, 7 d, 7 f, 7 g, 7 h	*24	24 a, 24 b, 7 h
8	8 a	*24 A	24 a, 24 c
*9 A	9 a, 9 c, 9 d	25	25 a, 25 b
9 L	9 a, 9 b, 9 c, 9 f	27	27 a, 27 b
9 N	9 a, 9 b, 9 e	*28	28 a, 16 b, 23 d
*9 V	9 a, 9 c, 9 d, 9 g	*29	29 a, 29 b, 29 c, 13 b
10	10 a, 10 b	31	31 a, 20 b
*10 A	10 a, 10 c, 10 d	32	32 a, 27 b
*11	11 a, 11 b, 11 e	*32 A	32 a, 32 b, 27 b
*11 A	11 a, 11 c, 11 d, 11 e	*33	33 a, 33 b, 33 d
*11 B	11 a, 11 b, 11 f	*33 A	33 a, 33 b, 33 d, 33 g, 20 b
12	12 a	*33 B	33 a, 33 c, 33 d, 33 f
13	13 a, 13 b	*33 C	33 a, 33 c, 33 e
14	14 a	34	34 a, 34 b
15	15 a, 15 b, 15 c, 15 f	35	35 a, 35 b, 34 b
15 A	15 a, 15 c, 15 d	*35 A	35 a, 35 c, 35 d, 20 b
15 B	15 a, 15 b, 15 e	*35 B	35 a, 35 c, 29 b
16	16 a, 16 b, 11 d	36	36 a, 9 e
17	17 a	37	37 a
*18	18 a, 18 b, 18 c, 18 f	38	38 a, 25 b
*18 A	18 a, 18 b, 18 d	*39	39 a, 10 d
*18 B	18 a, 18 b, 18 e, 18 g	*40	40 a, 7 g, 7 h
*18 C	18 a, 18 b, 18 c, 18 e	*41	41 a
*19	19 a, 19 b, 19 d	*42	42 a, 20 b, 29 c, 33 g, 35 c, 35 d

types mentioned. This is now used as diagnostic serum. In both sera the reactions heterologous to the 23-group are removed by absorption.

Table 6.

Comparison Between Two Diagnostic Sera, One Produced by Immunization with Type 23, the Other with Group 23 (Types 23, 23 A, 23 B).

Type	Capsular titer for diagnostic sera	
	Type 23 serum	Group 23 serum
23	160	160
23 A	16	160
23 B	8	160

3. Factor Sera.

The differential diagnosis of a pneumococcus type within the group of serologically near-related types to which it belongs is carried out by means of absorbed sera that are designated as factor sera. This form of examination is designated as factor determination.

If distinction has to be made between the two types in the 6-group, 6A and 6B, two sera are required, one of which reacts only with Type 6A, the other only with Type 6B. On absorption of serum 6A with Type 6B, the serum components that react with 6B are removed, and the absorbed serum will now give reaction only with Type 6A. Correspondingly, the serum specific for Type 6B is obtained by absorption of serum 6B with Type 6A. The two types are set up with the following formulae for capsular antigens:

$$6A = 6a, 6b$$

$$6B = 6a, 6c$$

6a signifies the antigen (or antigens) common to the two types. On the other hand, 6b and 6c signify the special antigen content of each type. By absorption of serum 6A with Type 6B, the mutual component 6a is removed, leaving a

serum 6b that is specific for Type 6A. Absorption of serum 6B with Type 6A removes the factor 6a too, leaving a serum 6c that reacts only with Type 6B. By means of these two sera, 6b and 6c, it is possible to make the differential diagnosis within the 6-group.

If the question concerns one of the groups consisting of several types, the procedure is fundamentally the same. For illustration, we may take the 11-group. This group comprises the Types 11, 11A and 11B. From the given formulae it is readily seen how the factor sera for differential diagnosis within the 11-group have to be produced. The formulae for the capsular antigens in the 11-group are given as follows:

$$11 = 11a, 11b, 11e$$

$$11A = 11a, 11c, 11d, 11e$$

$$11B = 11a, 11b, 11f.$$

Absorption of serum 11 with Type 11A removes the factors 11a and 11e, leaving a serum 11b; this serum reacts with Type 11 and with Type 11B, but not with Type 11A. If then serum 11A is absorbed with Type 11, factors 11a and 11e are removed, and the absorbed serum will contain 11c and 11d; as is evident from the formulae, this serum will react only with Type 11A. When, finally, serum 11B is absorbed with Type 11, factors 11a and 11d are removed, leaving a serum 11f that is specific for Type 11B. By means of these three absorbed sera, factor sera, it is possible now to differentiate the types within the 11-group as shown in Table 7.

Table 7.
Factor Sera for Group 11.

Type	Antigenic formula	Factor sera		
		11 b	11 c,d	11 f
11	11 a, 11 b, 11 e	+	—	—
11 A	11 a, 11 c, 11 d, 11 e	—	+	—
11 B	11 a, 11 b, 11 f	+	—	+

+ = positive capsular swelling.

— = no capsular swelling.

In a similar way the other factor sera can be produced. From the antigenic formulae it is easy to calculate the absorption processes required. Occasionally a serum has to be absorbed with several types, in order to isolate the factor wanted. As to the production of the factor sera not mentioned here, the reader is referred to the papers by Kauffmann, Mørch & Schmith (1940) and Mørch (1942).

The factor sera thus obtained have to be tested for specificity. As the given formulae are not complete, unexpected reactions may appear. It is essential, therefore, to make sure that the factor serum reacts only with the type (or types) with which it is expected to react according to the formulae. Thus, every factor serum is examined for capsular swelling with all the types belonging to the group. If undesirable reactions are demonstrated, they are removed by absorption. For example, if serum 11f is examined for capsular swelling with the 3 types of the 11-group (Types 11, 11A and 11B) it must react only with Type 11B. When the specificity is tested, the capsular titer of the finished serum is determined for the type (or types) with which it reacts.

If a factor serum is found to have such a low capsular titer that it cannot be employed for diagnosis, this serum has to be discarded and a new one produced from another portion of serum of the same type or, if possible, of a related type. In portions of serum from different rabbits or from the same rabbits at different points of time, the factors have developed in somewhat different degrees. Hence the potency of a factor serum is subject to some variation when it is prepared from various sera of the same type.

Experience has shown that these strongly absorbed sera weaken rather rapidly as to their capacity for the production of capsular swelling. Hence it is essential now and then to make control tests on these factor sera for capsular titer and replace the weak sera with new ones. A factor serum with a capsular titer below 8 is not very suitable for routine examinations. Sera with such a titer have to be replaced frequently, at least at intervals of 5—6 weeks.

The capsular titers for the factor sera indicate roughly how strongly the individual factors are represented in the different types — but only roughly as the sera used for the production of the factor sera differ in potency. Besides, the factor content of a serum will not give quite definite information about the antigenic factor content of the corresponding bacterial strain, as the individual rabbits differ in their development of the factors. These differences can be balanced to a great extent, however, by employment of at least 5 rabbits for the production of immune sera. As to the capsular titers that may be obtained for the various factor sera, the reader is referred to the preceding paper by the writer (1942).

Since serologically close-related pneumococcus types have been established as independent types, it has proved practical to employ the factor sera here described. It is impracticable to continue with the previous procedure — employing a specific serum for the diagnosis of each individual type. The reason for this is primarily the existence of pneumococcus types (7, 9A, 32 and 33) which, as far as we know now, contain no antigen particular to the type (see Table 5) but consist exclusively of antigens that are present also in other pneumococcus types. It will be impossible, therefore, to produce sera specific for these types.

REVIEW OF THE PNEUMOCOCCUS DIAGNOSIS.

All specimens received by the Pneumococcus Department of the State Serum Institute are examined directly, or after growth in serum broth, by means of the Neufeld reaction. This test is made in the first examination with 8 pooled sera A-H composed in such a way that each of the 68 established pneumococcus types gives capsular swelling in one — and only in one — of these sera. The examination includes invariably a special test with Type 3 because the diagnosis of this type is often associated with difficulties.

If capsular swelling is demonstrated with a pooled serum,

the Neufeld test is performed with sera corresponding to the individual types or groups entering into the respective pool. If capsular swelling is demonstrated in a serum corresponding to a single type, this establishes the diagnosis. If, on the other hand, the capsular swelling is demonstrated in a group-serum, it is necessary to perform the Neufeld test with the factor sera belonging to this group, in order to determine which of the types in the group concerned is encountered in the given case.

So, if we are dealing with a pneumococcus type belonging to one of the groups, the diagnosis is made in 3 stages: with 1) pooled sera, 2) type and group sera, and 3) factor sera. In the other cases the diagnosis is made in 2 stages: with 1) pooled sera and 2) type and group sera.

The Neufeld test is carried out as follows: A tiny amount of the specimen is placed on a slide by means of a platinum loop (not a whole loopful). By means of another loop a little serum is added to the droplet of specimen on the slide. The two elements are mixed thoroughly. A cover slip is placed on the mixture and pressed down firmly so as to prevent any current in the fluid. The preparation is examined under microscope with oil immersion lens (magnification $\times 1350$). It is examined thoroughly for capsular swelling of pneumococci possibly present. Every preparation ought to be examined twice, as it may take some time before the capsular swelling is formed, although the reaction most often appears instantaneously. Even when capsular swelling is demonstrated with one pooled serum, the examination is always continued with the other pooled sera, because the specimens are found not infrequently to contain more than one pneumococcus type.

If no pneumococci are demonstrated by a direct Neufeld test, the specimen is injected intraperitoneally in mice, and a blood agar plate is inoculated at the same time. The injection dose for mice is 0.5 cc. of sputum, spinal fluid, pleuritic fluid or similar specimens; with cultures from the swabs or with other cultures the injection dose is 1 cc. When the mouse is distinctly ill or dead, autopsy is performed under aseptic precautions. A blood agar plate is inoculated with heart's blood and with peritoneal exudate; in addition, a culture in 5% serum broth is made from the blood. The peritoneal cavity is lavaged with sterile salt solution, and this lavage is examined at once for Neufeld reaction. Next day the obtained results are compared to the outcome of the serum broth

culture. The blood agar plate is inspected for control, and sometimes pneumococci may be isolated from this plate that could not be demonstrated by the other methods. The mice that remain well are autopsied on the 4th day after the inoculation.

With this technique it has been possible to demonstrate the presence of pneumococci in a very high percentage of the specimens received.

SUMMARY.

An account is given on the production of diagnostic pneumococcus sera employed in the State Serum Institute. These sera are obtained by immunization of rabbits with one or several types of pneumococcus. The obtained immune sera are examined for cross reactions, and their capsular and agglutination titers are determined. The absorptions for removal of heterologous reactions are performed. In some instances, a pool of sera is made. The specificity of the finished sera is controlled and their capsular titers are determined.

The diagnostic sera employed are both monovalent sera (reacting with one type) and polyvalent (reacting with several types). The polyvalent sera are either group-sera (reacting with serologically near-related types) or pooled sera A-H (all the 68 types react with one of these sera). Polyvalent sera are obtained either by mixture of monovalent sera or by simultaneous immunization with several types.

A review is given of the technique of the pneumococcus diagnosis.

REFERENCES.

- Bjorneboe, M.*: *Z. Hyg.* 121:59, 1938.
 — *Z. Immunitätsforsch. u. exp. Therap.* 99:245, 1941.
Boyd, W. C. & H. Bernard: *J. Immunol.* 33:111, 1937.
Cooper, G. M., L. Mishulow & N. E. Blanc: *J. Immunol.* 6:25, 1921.
Cooper, G., M. Edwards & C. Rosenstein: *J. Exper., Med.* 49:461, 1929.

- Cooper, G., C. Rosenstein, A. Walter & L. Peizer: J. Exper. Med. 55:531, 1932.
- Cooper, G. M. & A. W. Walter: Am. J. Publ. Health 25:469, 1935.
- Finland, M. & J. W. Brown: J. Immunol. 35:141, 1938.
- Hektoen, L. & A. K. Boor: J. Inf. Dis. 48:588, 1931.
- Kauffmann, F., M. Bjorneboe & B. Vammen: Z. Hyg. 121:36, 1938.
- Kauffmann, F., E. Morch & K. Schmith: J. Immunol. 39:397, 1940.
- Lyall, H. W. & A. R. Odell: Am. Jour. Hyg. 29:103, 1939.
- Morch, E.: J. Immunol. (in the press).
- Robinson, E. S.: Am. J. Publ. Health 29:43, 1939.
- Silberstein, W.: Z. Hyg. 115:63, 1933.
- Vammen, B.: J. Immunol. 37:359, 1939.
- Walter, A. W.: Am. J. Publ. Health 28:54, 1938.
- Walter, A., Blount & M. W. Beattie: J. Inf. Dis. 66:181, 1940.
- Walter, A., H. V. Guevin, M. W. Beattie, H. Y. Cotler & H. B. Bucca: J. Immunol. (in the press).
- Welch, H., E. K. Borman & F. L. Mickle: Am. J. Publ. Health 29:35, 1939.

ÜBER WEITERE NEUE SALMONELLA-TYPEN.

Von F. Kauffmann.

(Eingegangen bei der Redaktion am 31. Jan. 1942).

In Ergänzung und Fortsetzung einer vorhergehenden Arbeit »Über mehrere neue Salmonella-Typen« sollen Untersuchungen über weitere neue Salmonella-Typen, die ich von P. R. Edwards resp. von E. Hormaeche im Laufe des Jahres 1941 erhalten hatte, mitgeteilt werden. Die Publikationen verschiedener Autoren über diese Typen sind wahrscheinlich bereits erschienen, waren mir aber auf Grund der augenblicklichen Verhältnisse nicht zugänglich. Trotzdem will ich im folgenden meine Ergebnisse veröffentlichen, um die Leser dieser Zeitschrift über die betreffenden neuen Typen zu orientieren.

I. Typen der Salmonella B-Gruppe.

1. *Salmonella kaapstad*.

Antigenstruktur IV.XII . . . c,h \longleftrightarrow 1,7 . . .

Diese Kultur (Nr. 1003) war unter der Bezeichnung; »Salmonella reading var. kaapstad« von M. W. Henning an P. R. Edwards gesandt und mir von ihm zur Nachprüfung übergeben worden. Wie man aus obiger Formel ersieht, unterscheidet sich dieser neue Typ serologisch von S. reading durch die 2. Phase 1,7 . . . Meiner Meinung nach darf man aber einen solchen Typ wie S. kaapstad nicht mit »S. reading var. kaapstad«

bezeichnen, da es in keiner Weise erwiesen ist, dass es sich hierbei um eine Varietät von *S. reading* handelt. Ferner ist daran zu denken, dass die serologischen Unterschiede zwischen diesen beiden und ähnlichen Typen sich keineswegs nur auf die in den gekürzten diagnostischen Formeln angegebenen Antigene zu beschränken brauchen, sondern dass darüber hinaus, speziell innerhalb der Körperantigene, sehr tiefgreifende Antigen Differenzen bestehen können. Von einer Kenntnis der vollständigen Antigenstruktur sind wir noch sehr weit entfernt, sodass wir mit Urteilen über phylogenetische Zusammenhänge sehr vorsichtig sein sollen.

2. *Salmonella* 24682.

Antigenstruktur IV.V.XII . . . e,h —.

In Bestätigung der Angaben von *P. R. Edwards*, von dem ich diesen aus einem Schweine isolierten Stamm erhielt, liegt hier eine monophasische *Salmonella*-Kultur mit den Antigenen IV.V.XII . . . e,h — vor, die bisher trotz aller Kunstgriffe (*Gard-Platte*) rein monophasisch blieb. Das mit dieser Kultur hergestellte H-Immunserum enthielt nur e,h-Agglutinine, die von der 1. Phase von *S. eastbourne* absorbiert werden konnten. Die Typ-Zugehörigkeit muss daher vorläufig offen bleiben; doch handelt es sich auf Grund des kulturellen Verhaltens (siehe Tabelle 6) möglicherweise um *S. reading*, zumal ich kürzlich von *A. Giovanardi* eine *Reading*-Kultur mit IV.V.XII . . .-Antigenen, die *G. Brotzu* isoliert hatte, erhielt.

3. *Salmonella arechavaleta*.

Antigenstruktur IV.V.XII . . a \longleftrightarrow 1,7 . . .

In Ergänzung meiner früheren Angaben über diesen Typ, der von *E. Hormaeche* und *C. A. Peluffo* isoliert wurde, konnte ich feststellen, dass 3 verschiedene Kulturen, die ich von *E. Hormaeche* erhielt, das V-Antigen besaßen.

Das a-Antigen von *S. arechavaleta* ist mit dem a-Antigen von *S. paratyphi* A nicht identisch, da jeder dieser beiden Typen einen stark entwickelten Sonderfaktor enthält. Dagegen

ist das a-Antigen von *S. arechavaleta* mit dem a-Antigen des weiter unten aufgeführten Typ *S. durban* identisch.

4. *Salmonella salinatis*.

Antigenstruktur IV.XII . . . d,e,h \longleftrightarrow d,e,n,z₁₅ . . .

Ich erhielt diesen neuen Typ, dessen H-Antigenanalyse Schwierigkeiten machte, von *P. R. Edwards* und konnte seine Angaben bestätigen.

Zunächst hatte ich den Eindruck, dass hier ein diphasischer Typ mit den Phasen d \longleftrightarrow d,e,n,z₁₅ . . . vorlag, wurde aber von *Edwards* darauf hingewiesen, dass die 1. Phase sehr schwach entwickelte e,h-Antigene enthielt. Während man in der Objektglas-Agglutination nur eine d-Agglutination erzielte, konnte man in der Reagenzglas-Agglutination schwach ausgebildete e,h-Antigene nachweisen.

Das Interessante an dieser Kultur ist jedoch die von *Edwards* und *Bruner* gefundene Tatsache, dass man durch Züchtung auf *Gard*-Platten mit entsprechenden Immunsereen 3 Phasen d — e,h \longleftrightarrow e,n,z₁₅ . . . isolieren konnte. Ich habe diese Befunde bestätigt und 3 Phasen isoliert, deren agglutinatorisches Verhalten in der Tabelle 1 wiedergegeben ist.

Tabelle 1.

Verhalten der 3 Phasen von *S. salinatis* in H-Faktoren-Seren.
(Reagenzglas-Agglutination).

Phase	H-Faktoren-Seren			
	d	h	n,z ₁₅	e, h
d	3200	< 50	< 50	< 50
e, h	< 50	6400	< 50	6400
e,n,z ₁₅ . . .	< 50	< 50	12800	800

Zeichenerklärung: Die Zahlen geben die Agglutinationstiter an.
Ablesung nach 4 Stunden 50° C. Wasserbad.

Die mit diesen 3 Phasen von *S. salinatis* hergestellten H-Immunsereen ergaben mit verschiedenen Kulturen Agglutinations-Resultate, die in der Tabelle 2 wiedergegeben sind.

Tabelle 2.

Ergebnisse der H-Reagenzglas-Agglutination mit den 3 Phasen-Seren von *S. salinatis*.

Kultur	H-Seren nicht absorbiert		
	d	e,h	e,n,z ₁₅
<i>S. salinatis</i> d	3200	< 50	< 50
„ e,h	< 50	6400	400
„ e,n,z ₁₅	< 50	800	3200
<i>S. typhi</i> = d	3200	< 50	< 50
<i>S. eastbourne</i> spez. = e,h	< 50	6400	400
<i>S. potsdam</i> β = e,n,z ₁₅	< 50	400	3200

Ablesung nach 2 Stunden Wasserbad 50° C.

Durch verschiedene Absorptionsversuche wurde festgestellt, dass das d-Antigen von *S. salinatis* nicht mit dem d-Antigen von *S. typhi* identisch ist, da beide Typen Sonderfaktoren enthalten. Die e,h-Antigene von *S. salinatis* sind mit den e,h-Antigenen von *S. eastbourne* identisch; ebenso sind die e,n,z₁₅-Antigene von *S. salinatis* mit den e,n,z₁₅-Antigenen von *S. potsdam* identisch. Deshalb verhalten sich die beiden Phasen e,h \longleftrightarrow e,n,z₁₅ von *S. salinatis* genau so wie die beiden Phasen von *S. san diego* (IV.[V].XII . . . e,h \longleftrightarrow e,n,z₁₅ . . .), von denen sie nicht zu unterscheiden sind, zumal auch das kulturelle Verhalten beider Typen dasselbe ist. Von *Edwards* und mir durchgeführte Versuche, aus *S. san diego* eine 3. Phase mit dem d-Antigen zu isolieren, schlugen fehl.

Auf Grund der bisherigen Versuche liegen folgende Befunde vor: a) Die Kultur (*S. salinatis*) ist ursprünglich diphasisch und enthält die beiden Phasen d,e,h \longleftrightarrow d,e,n,z₁₅ . . ., doch sind die e,h-Antigene der 1. Phase schwach entwickelt. b) Aus dieser Kultur lassen sich künstlich auf *Gard*-Platten 3 Phasen d — e,h \longleftrightarrow e,n,z₁₅ . . . isolieren, die als »natürliche« Phasen zu betrachten sind, da sie bei anderen Typen normalerweise, ohne jeden Kunstgriff, nachweisbar sind.

Man kann also zwischen spontan vorkommenden »natür-

lichen« Phasen und künstlich erzeugten »natürlichen« Phasen unterscheiden, wie folgendes Schema erläutert:

I. *Natürliche Phasen* (= natural or normal phases).

1) spontan vorkommend,

2) künstlich erzeugt.

z. B. I. 1) = a bei *S. paratyphi* A,

I. 2) = 1,5 ... bei *S. paratyphi* A.

II. *Künstliche Phasen* (= artificial or induced phases).

z. B. z_{11} bei *S. paratyphi* A oder j bei *S. typhi*.

Im Falle von *S. salinatis* wären dann die 3 Phasen $d - e, h \longleftrightarrow e, n, z_{15} \dots$ als künstlich erzeugte »natürliche« Phasen zu betrachten (= I. 2). Der Doppelpfeil zwischen e, h und e, n, z_{15} zeigt an, dass bisher nur zwischen diesen beiden Phasen ein Phasenwechsel festgestellt wurde. Dieses deutet darauf hin, dass die originale Kultur tatsächlich diphasisch ist, und dass die beiden serologischen Erscheinungsformen $d - e, h$ keine Phasen im strengsten Sinne des Wortes sind, sondern Verlustvarianten einer einzigen Phase (d, e, h). Durch Züchtung auf *Gard*-Platten wäre dann also nur der Antigenbestand der beiden originalen Phasen d, e, h und $d, e, n, z_{15} \dots$ vermindert worden.

Phase $d, e, h + e, h$ -Serum = d-Phase,

Phase » + d- » = e, h -Phase,

Phase $d, e, n, z_{15} \dots + e, n, z_{15}$ -Serum = d-Phase,

Phase » + d- » = $e, n, z_{15} \dots$ -Phase.

Diese letzte Phase braucht jedoch nicht künstlich gewonnen zu werden, da sie spontan von der e, h -Phase abgespalten wird; wie auch umgekehrt die e, h -Phase spontan aus der $e, n, z_{15} \dots$ Phase entstehen kann. Um diese beiden Phasen rein zu gewinnen, müssen sie auf *Gard*-Platten mit n, z_{15} - resp. mit h -Serum gezüchtet werden.

Genau genommen, haben wir es also bei *S. salinatis* mit 5 verschiedenen Erscheinungsformen des H-Antigens zu tun:

$d, e, h \longleftrightarrow d, e, n, z_{15} \dots$;

$d - e, h \longleftrightarrow e, n, z_{15} \dots$

In der Beurteilung der *S. salinatis*-Phasen bin ich weitgehend den Ansichten von *P. R. Edwards* und *D. W. Bruner*

gefolgt und möchte ihnen bei dieser Gelegenheit für ihre Mitarbeit bestens danken. Leider war mir die Publikation von *Edwards* und *Bruner* nicht zugänglich, sodass ich mich auf frühere briefliche Mitteilungen beschränken musste.

Der Fall *S. salinatis* zeigt deutlich, von wie grosser theoretischer Bedeutung neue *Salmonella*-Typen sein können, da man hierdurch ganz neue Einblicke in die Serologie der *Salmonella*-Gruppe, speziell in phylogenetische Zusammenhänge, erhält.

II. Typen der *Salmonella* D-Gruppe.

1. *Salmonella durban*.

Antigenstruktur IX.XII ... $a \longleftrightarrow e, n, z_{15} \dots$

Diese Kultur (Nr. 717) war von *M. W. Henning* an *P. R. Edwards* gesandt und mir von diesem zur Nachprüfung überlassen worden. Das O-Antigen von *S. durban* ist mit dem O-Antigen von *S. enteritidis* identisch. Das diphasische H-Antigen enthält die Antigene $a \longleftrightarrow e, n, z_{15} \dots$; doch ist das a-Antigen nicht mit dem a-Antigen von *S. paratyphi* A identisch, da beide Typen Sonderfaktoren enthalten. Wie schon oben erwähnt, stimmt das a-Antigen von *S. durban* mit dem a-Antigen von *S. arechavaleta* überein. Das $e, n, z_{15} \dots$ Antigen von *S. durban* ist mit dem $e, n, z_{15} \dots$ Antigen von *S. potsdam* identisch.

2. *Salmonella* 4675.

Antigenstruktur IX.XII ... $l, (z_{13}) \dots \longleftrightarrow 1, 5 \dots$

Ich erhielt diese Kultur von *P. R. Edwards*, der sie von *W. K. Mertens*, Batavia, erhalten hatte. Die Kultur lag ursprünglich nur in der 2. Phase vor; doch gelang es, mit Hilfe der Gard-Platte die 1. Phase zu isolieren, welche die Antigene $l, (z_{13}) \dots$ enthält. Die Klammer um das z_{13} -Antigen bedeutet, dass die Kultur nicht das volle z_{13} -Antigen enthält, da sie nicht imstande ist, das z_{13} -Serum (*S. uganda*) restlos zu erschöpfen. Die 3 Punkte hinter der Klammer sollen andeuten, dass die Kultur 4675 einen Sonderfaktor enthält, der nicht besonders benannt wurde, da es aus differentialdiagnostischen

Gründen vorläufig nicht notwendig ist. In der Tabelle 3 sind die wichtigsten Absorptionsergebnisse dargestellt.

Tabelle 3.
Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination.
H-Immunseren.

Kultur	1,z ₁₃			1,(z ₁₃)...		
	nicht ab- sorbiert	absorbiert mit		nicht ab- sorbiert	absorbiert mit	
		1,v	1,(z ₁₃)...		1,v	1,z ₁₃
S. london=1,v	×	—	—	×	—	—
S. uganda=1,z ₁₃	×	×	×	×	×	—
4675=1,(z ₁₃)...	×	×	—	×	×	×

Zeichenerklärung: × = flockige Agglutination.

— = keine Agglutination ab 1:50.

Es handelt sich also bei der Kultur 4675 um einen neuen *Salmonella*-Typus, der bisher noch nicht benannt wurde.

III. Typen der *Salmonella* E-Gruppe.

1. *Salmonella weltevreden*.

Antigenstruktur III.X.XXVI. $r \longleftrightarrow z_6 \dots$

P. R. Edwards hatte diese Kultur von *W. K. Merfens*, Batavia, erhalten und sie mir übersandt. Ich konnte die angegebene Antigenformel bestätigen und fand, dass die O-Antigene von *S. london* und *S. weltevreden* identisch sind. Ferner sind die r-Antigene von *S. virchow* und *S. weltevreden* sowie die $z_6 \dots$ Antigene von *S. kentucky* und *S. weltevreden* identisch. In Bestätigung der Angaben von *P. R. Edwards* fand ich, dass ein mit *S. bantam* bezeichneter Stamm aus Batavia zu *S. meleagridis* gehört.

2. *Salmonella illinois*.

Antigenstruktur (III).(XV).XXXIV. $z_{10} \longleftrightarrow 1,5 \dots$

In Ergänzung meiner früheren Mitteilungen kann ich die

O-Formel mit (III).(XV).XXXIV. angeben. Die Klammern um die III- und XV-Antigene bedeuten, dass nicht die vollen III- und XV-Antigene vorhanden sind. Der Sonderfaktor XXXIV kann dadurch dargestellt werden, dass man ein O-Serum von *S. illinois* mit *S. newington* + *S. typhi* absorbiert. Sättigt man das Serum nur mit *S. newington* ab, so bleibt noch ein auf *S. typhi* übergreifendes Agglutinin zurück, das in der Formel nicht besonders bezeichnet ist.

Das z_{10} -Antigen von *S. illinois* ist mit dem z_{10} -Antigen von *S. glostrup* identisch.

In der Tabelle 4 sind einige O-Absorptions-Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 4.
Ergebnisse der O-Absorption (Reagenzglas-Agglutination).
O-Immunseren.

Kultur	S. london			S. newington				S. senftenberg		S. illinois	
	nicht absorbiert	absorbiert mit		nicht absorbiert	absorbiert mit			nicht absorbiert	absorb. mit Ill.	nicht absorbiert	absorb. mit New.
		New.	Ill.		Lon.	Ill.	Lon. + Ill.				
S. london	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+	—
S. newington	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—
S. senftenberg	+	—	+	+	—	+	—	+	+	+	—
S. illinois	+	—	—	+	+	—	—	+	—	+	+

Zeichenerklärung: + = Agglutination positiv; — = Agglutination negativ.
New. = *S. newington*, Ill. = *S. illinois*, Lon. = *S. london*.

3. *Salmonella* 11076.

Antigenstruktur I.III.XIX. z_{27} —.

Dieser mir von *P. R. Edwards* zur Nachprüfung übersandte Stamm, der aus einem gesunden Menschen isoliert wurde, enthält — in Bestätigung von *Edwards* — das O-Antigen von *S. senftenberg* und ein neues H-Antigen z_{27} . Diese Kultur ist besonders empfindlich gegen O-Agglutinine.

IV. Typen weiterer Gruppen.

1. *Salmonella* pretoria.

Antigenstruktur XI. $k \longleftrightarrow 1,2,3 \dots$

Ich erhielt diesen neuen Typ von *P. R. Edwards*, der ihn

von M. W. Henning bekommen hatte, und konnte die angegebene Antigenformel bestätigen. Die O-Antigene von *S. pretoria* und *S. aberdeen* sind identisch, ebenso die k-Antigene von *S. pretoria* und *S. thompson*.

2. *Salmonella havana*.

Antigenstruktur I.XIII.XXIII. f,g . . . —.

In Ergänzung meiner früheren Mitteilungen über diesen von F. Schiff und I. Saphra beschriebenen Typ kann ich auf Grund eigener Untersuchungen die Antigenformel bestätigen. Die O-Antigene von *S. havana* und *S. worthington* sind identisch; dagegen sind die H-Antigene von *S. havana* und *S. derby* nicht völlig identisch. Zwar vermochte *S. havana* zwei verschiedene H-Seren von *S. derby* völlig zu erschöpfen, doch konnten zwei Stämme von *S. derby* das H-Serum von *S. havana* nicht restlos absorbieren; es blieb ein kleiner H-Agglutinin-Rest für *S. havana* im Serum zurück.

3. *Salmonella amherstiana*.

Antigenstruktur (VIII). I,(v) . . . $\leftarrow \rightarrow$ 1,6 . . .

Diese von P. R. Edwards erhaltene Kultur (Nr. 78) enthält — in Bestätigung der Angaben von Edwards — einen Teil des VIII-Antigens, wie es aus der Tabelle 5 hervorgeht.

Es geht aus der Tabelle 5 hervor, dass *S. amherstiana* nur einen Teil des komplex gebauten VIII-Antigens enthält, der

Tabelle 5.
Ergebnisse der O-Absorption.
(Reagenzglas-Agglutination).
O-Immunsere.

Kultur	S. newport		S. kentucky		S. amherstiana		
	nicht absor- biert	absorb. mit Thompson + Amherst.	nicht absor- biert	absorb. mit Amherst.	nicht absor- biert	absorb. mit	
						Newport	Kentucky
S. newport	+	+	+	—	+	—	+
S. kentucky	+	—	+	+	+	—	—
S. amherstiana	+	—	+	—	+	—	+

Zeichenerklärung: + = Agglutination positiv; — = Agglutination negativ. Amherst. = *S. amherstiana*.

jedoch grösser ist als das (VIII)-Antigen von *S. kentucky*. Da *S. amherstiana* nicht das VI-Antigen besitzt, werden VI.VII-Stämme nicht vom *S. amherstiana*-Serum agglutiniert. Aus diesem Grunde wurde *S. amherstiana* nicht in die *Salmonella* C-Gruppe eingereiht, sondern neben *S. kentucky* gestellt.

Das diphasische H-Antigen von *S. amherstiana* enthält in seiner 1. Phase ein kompliziert gebautes Antigen, das gekürzt mit l,(v) ... angegeben wurde. Ausser dem l-Antigen ist ein Teil des v-Antigens vorhanden sowie ein Sonderfaktor, der nicht besonders benannt wurde. Auf eine vollständige Wiedergabe der zahlreichen Absorptionsversuche, die ich mit den H-Seren von *S. london*, *S. dar es salaam*, *S. uganda* und *S. amherstiana* ausführte, will ich aus Platzmangel verzichten, zumal sich meine Ergebnisse prinzipiell mit denen von *P. R. Edwards* decken.

4. *Salmonella urbana*.

Antigenstruktur XXX. $b' \longleftrightarrow e, n, x \dots$

In Ergänzung meiner früheren Angaben über diesen von *P. R. Edwards* und *D. W. Bruner* beschriebenen Typ will ich nur erwähnen, dass die b-Antigene von *S. urbana* und *S. paratyphi* B nicht identisch sind, sondern stark entwickelte Sonderfaktoren enthalten.

Über das kulturelle Verhalten der oben erwähnten Typen, soweit es nicht bereits früher publiziert wurde, gibt die Tabelle 6 Auskunft.

Es geht aus der Tabelle 6 hervor, dass es sich bei allen 12 Typen kulturell um typische *Salmonella*-Stämme handelt, die alle ammonstark sind. Die Unterschiede, die auf Ammon-Dulcit und Ammon-Rhamnose bei den Stämmen 24682 resp. 4675 zu Tage treten, lassen sich bereits in den gewöhnlichen Peptonbouillon-Substraten erkennen, sodass die Anwendung der Ammonnährböden in diesen Fällen ohne jeden differentialdiagnostischen Wert war.

Es sei hierbei erwähnt, dass ich die Ammon-Nährböden (= *Simmons*-Nährböden) genau nach der Vorschrift von *J. Hohn* und *W. Herrmann* hergestellt habe und mit den von mir früher benutzten Nährböden verglichen habe. Unter

Heranziehung von 38 verschiedenen Salmonella-Kulturen, die zu den verschiedenen Ammontypen gehörten, konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Nährböden festgestellt werden.

Tabelle 6.

	S- kaapstad	S. 24682	S. arecha- valeta	S. salinatis	S. durban	S. 4675
Adonit, Lactose, Saccharose, Salicin	—30	—30	—30	—30	—30	—30
Indol	—	—	—	—	—	—
Arabinose, Dextrose, Maltose, Mannit, Sorbit, Trehalose, Xylose, H ₂ S	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Dulcit	+1	+1	+1	+1	+1	—30
Inosit	+1	—30	—80	—30	—30	—30
Rhamnose	+1	+6	+1	+1	+1	+1
Gelatine	—60	—60	—60	—60	—60	—60
Stern Glycerin	+++1.2	+++1.2	+++5.6	+++1.2	+++1.2	+++1.2
d-Tartrat	+1	+1	+1	+1	+1	+1
l-Tartrat	+6.7	+7	+5.6	+5.7	+6	+5
i-Tartrat	—14	—14	—14	—14	—14	—14
Na-Citrat	+1	+1	+1	+1	+1	+1.2
Mukat	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Ammonagar mit Arabinose, Dextrose, Na-Citrat	+	+	+	+	+	+
Ammonagar mit Dulcit	+	+	+	+	+	—
Ammonagar mit Rhamnose	+	—	+	+	+	+

Tabelle 6 (Fortsetzung).

	S. welte- vreden	S. illinois	S. 11076	S. pretoria	S. havana	S. amher- stiana
Adonit, Lactose, Sac- charose, Salicin	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀	— ₃₀
Indol	—	—	—	—	—	—
Arabinose, Dextrose, Dulcit, Maltose, Man- nit, Rhamnose, Sor- bit, Trehalose, H ₂ S	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Inosit	+ ⁶	+ ¹	— ₃₀	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Xylose	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	— ₃₀
Gelatine	— ₆₀	— ₆₀	— ₆₀	— ₆₀	— ₆₀	— ₆₀
Stern Glycerin	++ ¹⁻²	++ ¹⁻²	++ ¹⁻²	++ ¹⁻²	++ ¹⁻²	++ ¹⁻²
d-Tartrat	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
l-Tartrat	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
i-Tartrat	+ ⁴	— ¹⁴	— ¹⁴	+ ³	+ ²	+ ²⁻³
Na-Citrat	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Mukat	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Ammonager mit Ara- binose, Dextrose, Dul- cit, Rhamnose, Na- Citrat	+	+	+	+	+	+

Zeichenerklärung: +¹ = positiv nach 1 Tage; +⁶⁻⁷ = positiv nach 6—7 Tagen; —₃₀ = negativ nach 30 Tagen. Bei Stern Glycerin: ++¹⁻² = lila nach 1—2 Tagen. Die Ablesung der Ammonnährböden erfolgte nach 4 Tagen.

Sämtliche Kulturen bildeten Gas aus Dextrose und Mannit. Bei *S. arechavaleta* und *S. pretoria* kann es zur Schleimwallbildung kommen. Alle Kulturen waren gramnegative, bewegliche Stäbchen, die auf Brillantgrünagar wuchsen.

Ferner sei bei dieser Gelegenheit noch kurz auf eine serologische Frage, welche die Herstellung der O-Immunseren betrifft, eingegangen. *E. Carlinfanti* gab kürzlich an, dass Typhus O-Seren, die mit 2 Stunden auf 100° C. erhitzten Kulturen hergestellt waren, sehr hohe H-Titer zwischen 1 : 3200—1 : 12800 hatten. Nach Rückfrage bei *Carlinfanti* über nähere technische Einzelheiten habe ich 2 Kaninchen mit einer Typhus-Bouillonkultur des Stammes H 901, die sehr beweglich und 2 Stunden lang im Wasserbade auf 100° C. erhitzt war, immunisiert. Die fertigen Seren wurden mit der Kultur O 901, die 1 Stunde lang im Dampftopfe erhitzt war, zweimal in der Verdünnung 1 : 10 absorbiert, um alle O-Agglutinine zu entfernen, und dann mit der Formalin-Bouillonkultur des Stammes H 901 agglutiniert. Das eine Serum agglutinierte diese Kultur flockig bis 1 : 80, das andere gab in der Verdünnung von 1 : 20 keine Agglutination (Ablesung nach 4 Stunden 50° C. Wasserbad). Die O-Titer beider Seren betrugen 1 : 6400.

Im Gegensatz zu den Angaben von *Carlinfanti* was es mir also — allen früheren Erfahrungen gemäss — nicht gelungen, bei Immunisierung mit 100°-Bakterien hohe H-Titer zu erzielen, sodass von einer Thermostabilität des H-Antigens keine Rede sein kann.

Ausserdem habe ich noch ein O-Serum von *S. enteritidis*, das mit einer 2½ Std. lang auf 100° C. im Dampftopfe erhitzten Bouillonkultur hergestellt war, mit gekochten *S. enteritidis*-Bakterien absorbiert und ab 1 : 20 keine H-Agglutinine nachweisen können.

Man kann also sagen, dass die O-Immunseren nicht immer völlig frei von H-Agglutininen sind, dass aber die eventuellen H-Titer sehr niedrig sind und bei der üblichen Technik die O-Antigenbestimmung in keiner Weise stören. Ich möchte nochmals darauf hinweisen, dass die O-Immunseren mit Kulturen hergestellt werden sollen, die 2½ Std. im strömenden Dampfe (100° C.) erhitzt sind.

Abschliessend sind zwecks besserer Übersicht die Antigenformeln der oben besprochenen Salmonella-Typen in der Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7.
Auszug aus dem Kauffmann-White-Schema.

Typ	O-Antigen	H-Antigen	
		1. Phase	2. Phase
S. kaapstad	IV.XII ...	e,h	1,7 ...
S. arechavaleta	IV.V.XII ...	a	1,7 ...
S. salinatis	IV.XII ...	d,e,h	d,e,n,z ₁₅ ...
S. durban	IX.XII ...	a	e,n,z ₁₅ ...
S. 4675	IX.XII ...	l,(z ₁₃) ...	1,5 ...
S. weltevreden	III.X.XXVI.	r	z ₆ ...
S. illinois	(III).(XV).XXXIV.	z ₁₀	1,5 ...
S. 11076	I.III.XIX.	z ₂₇	—
S. pretoria	XI.	k	1,2,3 ...
S. havana	I.XIII.XXIII.	f,g ...	—
S. amherstiana	(VIII).	l,(v) ...	1,6 ...
S. urbana	XXX.	b	e,n,x ...

Zusammenfassung.

Es werden serologische und kulturelle Untersuchungen an weiteren, neuen Salmonella-Typen mitgeteilt. Von diesen Typen verdient *S. salinatis* ein besonderes Interesse, da aus der ursprünglich diphasischen Kultur (IV.XII ... d,e,h ↔ d,e,n,z₁₅ ...) mit Hilfe von Gard-Platten 3 natürliche Phasen d — e,h ↔ e,n,z₁₅ ... isoliert wurden.

Beiläufig werden einige Bemerkungen über Ammonnährböden sowie über die Thermolabilität des H-Antigens gemacht.

LITERATUR.

- Carlinfanti, E.: Boll. Ist. Sier. Mil. 20, 367, 1941.
Hohn, J. und W. Herrmann: Arch. Hyg. 125, 354, 1940.
Kauffmann, F.: Acta path. et microbiol. scand. 48, 351, 1944.
— »Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe« bei Einar Munksgaard, Kopenhagen 1941.

RECHERCHES SUR LA FERMENTATION MUTATIVE DES BACTÉRIES.

Par Martin Kristensen.

(Reçu par la rédaction le 18. février 1942).

III. Cours de mutation chez 6 souches différentes de *Salmonella dublin*.

Dans le mémoire précédent (Vol. 17, p. 193) nous avons analysé le cours de la mutation d'une seule souche (F 4216/38—39) de *Salmonella dublin*. Pour se faire une idée du degré jusqu'auquel on pourra généraliser les résultats obtenus, on a fait à titre de renseignement, l'examen d'un nombre supplémentaire de souches. Dans ce but on a choisi 6 souches du type sérologique *Salmonella dublin*, qui toutes faisaient fermenter de manière mutative la l-arabinose (Ar). Les six souches avaient été choisies de manière à présenter les différences les plus grandes possible quant à l'âge, la provenance et les propriétés fermentatives envers d'autres substances que l'Ar. Cependant il ne s'agissait que de 3 types fermentatifs, dont l'un représenté par 4 souches (les numéros 1—3 et 5). Nous considérons comme étant sans importance la différence entre la réaction faible et la réaction faisant complètement défaut dans le milieu de *Stern*. La souche F 4216/38—39 antérieurement examinée appartenait au même type qui est de beaucoup le plus fréquent. L'origine des souches etc. ressortira du tableau 5.

Tableau 5.
Souches de *Salmonella dublin*.

Numéro d'ordre	Numéro original	Isolé en	Origine	Fermentation de		
				Xylose	Rhamnose	Glycérine (Stern)
1	171 ¹⁾	1922	Lait de vache	+ ¹	+ ¹	(+)
2	L 50/22	1922	Sang	+ ¹	+ ¹	(+)
3	U 3509/30	1930	Urine	+ ¹	+ ¹	(+)
4	Sp. 56/34—35	1935	Liq. céph.-rach.	+ ²²	+ ¹	++
5	F 7871/39—40	1939	Fèces	+ ¹	+ ¹	0
6	Type II D 406/30 ²⁾	1930 (?)	Bétail	+ ¹	0 ³³	(+)

1) Institut sérologique vétérinaire de l'État danois.

2) *Pesch & Krämer*, Zbl. Bakter. I. Abt. Orig. vol. 118, p. 136 (1930).
Les souches nos. 1—5 proviennent de différentes localités du Danemark.

De la même manière qu'auparavant on a ensemencé ces souches dans des tubes contenant de l'Ar, chacune dans 53 tubes, observés pendant 90 jours, si aucune coloration jaune ne s'était produite avant, ce qui était le cas pour tous les tubes, excepté un tube contenant la souche 2, et 2 tubes contenant la souche 4.

Le cours de la mutation des 6 souches est inscrit dans la fig. 4, où, vu l'importance d'une comparaison avec la fig. 2 (vol. 17, p. 216) on s'est servi du même système logarithmique que dans celle-là. La particularité constatée alors, à savoir que la fréquence de mutation était plus grande à un stade ultérieur qu'au début, se retrouve pour les souches 1, 2, 3 et 5, tandis que pour les souches 4 et 6 la courbe est plutôt rectiligne dans son ensemble; dans les 6 souches les premiers tubes prennent une couleur jaune déjà après 2 ou 3 fois 24 heures.

De chacune des 6 séries on a ensemencé sur une plaque d'Ar, tant des 6 tubes mutés les premiers que de 4 ou 6 tubes qui n'ont muté qu'au bout de 20 jours ou plus tard. Pour les souches 1, 3, 4, 5 et 6 les mutants tardifs se montraient, somme toute, d'une fermentation beaucoup plus faible que

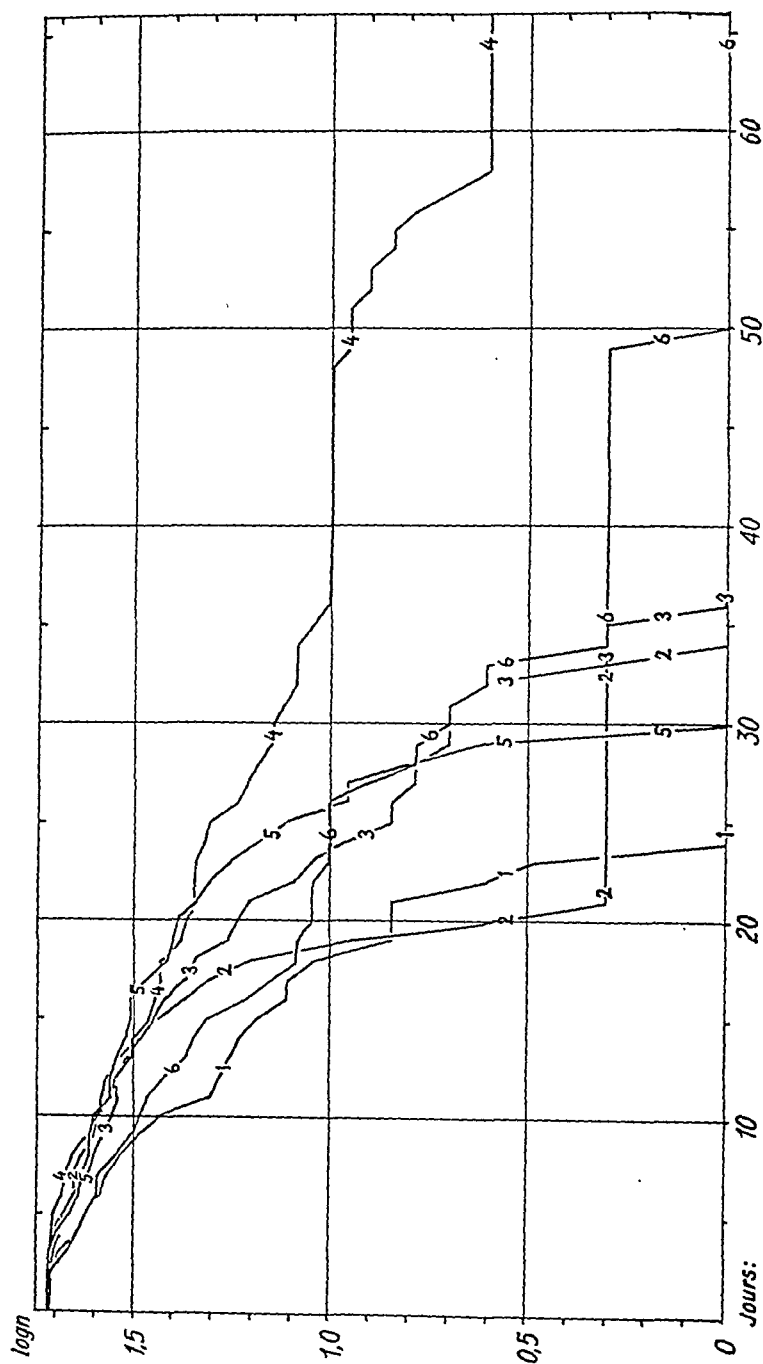


Fig. 4.

les mutants précoces, tandis que pour la souche 2 on n'a constaté aucune différence certaine. Pour les souches 1, 3, 5 et 6 on a réussi, par des réensemencements réitérés dans des tubes d'Ar, à faire continuer la mutation d'un mutant faible de manière à en faire un mutant fort; pour la souche 4 où on a opéré avec un mutant d'une fermentation spécialement faible, cette transformation n'a pas réussi.

Ainsi nous avons retrouvé la forme ordinaire de la courbe de mutabilité, constatée pour la souche examinée déjà, pour les 4 souches étudiées dans cette expérience, et qui, quant à leurs propriétés fermentatives étaient des *Salmonella dublin* typiques; le fait que les mutants tardifs étaient, somme toute, d'une fermentation plus faible que les mutants précoces, doit aussi être considéré comme une propriété fréquente dans le type *Salmonella dublin*.

IV. *Dépendence de la fermentation mutative à l'égard du volume de culture.*

Dans son étude sur la fermentation mutative de la l-arabinose chez le para-coli-bacille *Christiansen* appelle l'attention sur le fait que dans un grand volume de culture (par ex. 50 c. c.) cette fermentation survient plus vite et avec moins de variation que dans un petit volume (par ex. 5 c. c.). *Christiansen* décrit ce phénomène comme une entrave dans le petit volume par suite de mauvaise nutrition. Cependant une discussion plus approfondie de la provenance de cette »entrave« serait à propos. Si on ensemence une certaine quantité de bouillon pour la répartir ensuite dans des récipients de grandeur différente, tout en faisant en sorte que les conditions de nutrition ordinaires, surtout en ce qui regarde l'aérobiose, soient égales partout, on présumerait que toutes les fonctions vitales des bactéries seraient égales dans les différentes cultures. Tout de même, comme nous allons voir, la fermentation survient généralement beaucoup plus vite dans

le grand volume que dans le petit.*) Ceci se comprendra cependant facilement selon nos idées générales sur la nature de la fermentation mutative. Il est permis de croire qu'une quantité totale de culture de 50 c. c. se comporte comme 10 portions de 5 c. c. chacune. La probabilité d'une mutation survenue dans le volume de 50 c. c. égale donc la probabilité d'une mutation dans un ou plusieurs des 10 tubes de 5 c. c., évidemment cette probabilité est plus grande que la probabilité d'une mutation dans un seul de ces tubes choisi d'avance. En indiquant par p la probabilité de ce qu'une mutation ne soit pas survenue à une époque donnée dans une certaine quantité de culture V , la probabilité de la non-survenue d'une mutation à la même époque dans une quantité de culture nV sera p^n , selon la règle ordinaire de la probabilité composée. Provisoirement nous avons supposé n un nombre entier, mais on démontrera sans difficulté que la même expression vaudra, si $n = \frac{r}{s}$, où r et s sont des entiers arbitraires. Nous désignons les probabilités de la non-survenue de mutations dans les volumes V , rV et $\frac{r}{s}V$ comme respectivement p_1 , p_2 et p_3 . Alors

$p_2 = p_1^r = p_3^s$, d'où $p_3 = p_1^{\frac{r}{s}}$, ce qu'il fallait démontrer.

Que $p(nV)^{**}) = [p(V)]^n$ peut s'exprimer aussi de la manière suivante: $\log [p(nV)] = n [\log p(V)]$. En désignant l'occurrence des mutations selon le système »logarithmique« appliqué dans les figs. 2, 3 et 4, on verra que l'emploi d'un volume de culture n fois plus grand rendra n fois plus grande la chute de la courbe.

En réalité, ce que nous observons ce n'est pas le moment même de la mutation, mais le moment où toute la quantité de culture s'est teinte en jaune par suite d'une acidification. Il faut en retrancher la période latente s'écoulant depuis l'occurrence de la mutation jusqu'à la constatation de la coloration jaune de la culture; ceci est dit sans considération du

*) Même si on ensemence d'un nombre égal de bactéries les deux quantités différentes de milieu, ceci ne comportera qu'une »différence d'âge« de quelques heures.

**) c'est à dire la probabilité correspondant au volume nV .

fait que cette période n'est pas tout à fait constante. Si nous supposons deux séries de cultures, l'une d'un volume V_1 et d'une période latente t_1 , l'autre d'un volume $V_2 = nV_1$ et d'une période latente t_2 , et le nombre de cultures de chaque série si grand que nous osons assimiler la probabilité à la fréquence, et si à l'époque t aucune *coloration jaune* ne s'est produite dans une fraction p des tubes à volume V_1 (c. à d. qu'un jaunissement est survenu dans la fraction $q = 1 - p$), p sera la fraction des verres dans laquelle aucune *mutation* n'est survenue à l'époque $t - t_1$; en même temps la mutation ne sera pas survenue dans la fraction p^n des cultures à volume V_2 , et à l'époque $t - t_1 + t_2$ cette fraction des verres ne sera pas encore teinte en jaune. Pour les séries courtes il est d'importance de se rappeler que la fréquence de la mutation peut diverger de la probabilité avec en écart moyen de \sqrt{Npq} , où N désigne le nombre de cultures. L'application de cette formule aux comparaisons entre deux séries faites dans la suite, n'est pourtant pas tout à fait facile, et pour les exemples traités ci-dessous nous nous contenterons de décider par une évaluation estimative, si la divergence entre la fréquence attendue et la fréquence observée dépasse ce qui peut être considéré comme fortuit.

Comme une épreuve justifiant l'application de l'expression p^n en parlant de la fréquence de mutation dans un volume multiplié par n , on a fait cette expérience: le même bouillon qui avait été infecté de *Salmonella dublin*, et qui, comme mentionné vol. 17, p. 202, fut réparti en 96 tubes de 2,2 c. c. chacun, fut en même temps mis en 10 flacons coniques, 60 c. c. dans chacun, donc environ 27 fois autant que dans les tubes. La grandeur et le volume de liquide des flacons étaient choisis de manière à ce que le rapport entre la surface et le volume fut égal, autant que possible, dans les flacons et dans les tubes; on devrait donc pouvoir compter que le degré d'aérobiose était le même dans tous les cas. Or, il s'est trouvé que 7 des 10 flacons ont jauni le troisième jour, les 3 autres le quatrième jour. Comme il ressort du tableau 1 (vol. 17, p.

204), 2 des 96 tubes se sont montrés positifs le deuxième jour et 5 le troisième jour; la fraction du nombre total des tubes qui n'avait pas jauni au bout de deux fois 24 heures était donc $\frac{94}{96}$; au bout de 3 fois 24 heures la fraction était $\frac{89}{96}$. Une expérience sur la période latente de la fermentation en flacons de 60 c. c. a été faite en même temps que l'expérience des tubes, mentionné vol. 17, p. 208. Il en ressortait que la période latente était d'une fraction d'un jour plus longue dans les flacons que dans les tubes, conséquence naturelle de ce que le nombre de bactéries nécessaire pour jaunir le contenu d'un flacon est de 27 fois plus grand que le nombre nécessaire pour jaunir le contenu d'un tube. En assimilant — malgré l'incertitude statistique considérable qui s'y rattache — et pour les cultures et pour les tubes les fréquences aux probabilités, la fraction (0,3) des cultures des flacons non-jaunies 3 jours après l'ensemencement doit, selon notre théorie, être mise en relation à la fraction des cultures des tubes qui n'avait pas jauni à une époque au cours du troisième jour. Nous pourrions donc établir l'inégalité suivante:

$$\left(\frac{94}{96}\right)^{27} > 0,3 > \left(\frac{89}{96}\right)^{27}$$

qu'on peut convertir ainsi:

$$94 > 96 \cdot 0,3^{\frac{1}{27}} = 91,8 > 89$$

Au lieu des 96 tubesensemencés en même temps que les flacons, nous aurions pu prendre la matière complète des 998 tubes; en outre nous aurions pu examiner l'état des choses à d'autres époques; en tous cas nous trouverions une concordance satisfaisante entre la théorie et l'observation. Évidemment les matériaux considérés sont trop restreints pour pouvoir fournir une *preuve* véritable de la justesse de la théorie; ce que nous venons de dire est plutôt destiné à servir d'*illustration*, puisqu'il va presque sans dire que la théorie est valable, si les conditions vitales sont égales dans la grande et dans la petite quantité de culture. Inversement il est possible, à l'aide de cette théorie, d'examiner si les conditions de mutabilité sont égales dans des cultures différentes à vo-

lume différent. Nous allons analyser d'abord quelques expériences publiées par *Schmit-Jensen* et mentionner ensuite des résultats de notre propre expérience.

Schmit-Jensen a comparé (p. 100, tableau 1) la fermentation mutative de la l-arabinose par un »para-colibacille« dans 20 tubes de culture de 3 c. c., dans 40 tubes étroits (microtubes de fermentation) de 0,1 c. c., et dans 20 tubes étroits de 0,05 c. c.. Au bout de 8 jours une fermentation visible était survenue dans 6 des 20 tubes, mais aucune dans les microtubes de fermentation. D'après le nombre de mutations observées dans les tubes on s'attendrait (en faisant abstraction des différences qui pourraient se produire pendant la période latente, allant de la mutation jusqu'au jaunissement) à ce nombre de fermentations dans les 20 tubes de 0,1 c. c.:

$40-40 \cdot \left(\frac{14}{20}\right)^{\frac{0,1}{3,0}} = 0,5$, et à ce nombre de fermentations dans les

20 tubes de 0,05 c. c.: $20-20 \cdot \left(\frac{14}{20}\right)^{\frac{0,05}{3,0}} = 0,1$. La concordance entre la théorie et l'observation est ici satisfaisante. Cependant, dans les périodes ultérieures, surtout pendant la troisième semaine, la mutation se produit dans les tubes étroits d'une vitesse beaucoup plus grande que celle à laquelle on s'était attendu. Il faut donc qu'il se soit produit, après les premiers 8 ou 10 jours, des conditions de mutabilité particulièrement favorables dans ces tubes; nous ne nous voyons pas à même d'en donner une explication.

En outre *Schmit-Jensen* a comparé la mutation de l'isocolibacille devant la rhamnose, partie en 20 tubes de 3 c. c., partie en 120 microtubes de fermentation, contenant des liquides variant de 0,05 à 0,20 c. c.; les 120 tubes contenaient en tout 15 c. c., correspondant au contenu de 5 tubes de 3 c. c. Au bout de deux jours une fermentation s'est produite dans tous les tubes ordinaires, mais dans aucun des tubes étroits. Pour autant qu'on peut supposer que la période latente ne soit pas plus longue dans les microtubes que dans les tubes ordinaires (on devrait plutôt la supposer plus courte), on en pourra conclure avec une grande certitude, que les conditions de mutabilité étaient moins bonnes dans ceux-la que dans ceux-ci. Ici on ne peut pas se servir de la formule jusqu'ici appliquée, mais la probabilité pour que 20 cas de fermentation surviennent tous dans un groupe déterminé de 20 verres, et aucun cas dans un autre groupe de 5 verres peut être calculée de la manière suivante; 1:

$$\binom{25}{5} = \frac{1}{53130}.$$

Nous allons rapporter, en passant sur quelques détails

techniques (nettoyage et triage des tubes, contrôle de ce que les acidifications observées ne soient pas dues aux souillures etc.), deux séries d'expériences faites par l'auteur.

I. Une quantité du milieu ordinaire a été répartie dans les tubes suivants:

A. 20 tubes Jena Fiolax, mesurant 8—8,5 mm de diamètre intérieur, 2 c. c. dans chaque tube (c. à d. une couche ayant 3,5—4 cm de hauteur).

B. 19 tubes comme ceux mentionnés sous A, mais enduits de 1 c. c. d'huile de paraffine.

C. 20 tubes comme B, mais contenant une quantité de milieu de seulement 0,2 c. c.

D. 49 pipettes Pasteur de verre »A.R.«, mesurant 2—2,5 mm de diamètre intérieur, une couche de milieu de 5 cm de hauteur, volume moyen de milieu: 0,25 c. c.

Ces verres différents ont tous étéensemencés d'une quantité de culture fraîche de *Salmonella dublin* égale pour tous les verres par rapport au volume entier. Pour les pipettes l'ensemencement du milieu a été fait, avant qu'elles l'aient reçu. Ensuite on a fermé au chalumeau les pointes des pipettes, et on a pris soin que le milieu se rassemblât le plus près du bout formé.

Les pipettes ont été placées horizontalement; cependant, au bout de dix jours, on en a mis 12 le bout fermé tourné en haut, 13 le bout fermé tourné en bas, tandis que 24 restaient couchées horizontalement. Pour entraver l'évaporation ou a imprégné les tampons d'ouate avec de la paraffine; plus tard on les a encore étanchées avec un peu de plastiline. A la fin de l'expérience la fuite constituait cependant de 6 jusqu'à 21 mm dans les différents verres.

Les verres B restaient longtemps d'un vert jaunâtre contrairement aux verres A, qui prirent vite une forte couleur bleue. Cette différence témoigne certainement d'un accès plus restreint d'oxygène aux verres B qu'aux verres A. Des signes semblables de »réduction« ont été observés pendant les premiers jours dans les pipettes Pasteur, exception faite de la partie périphérique du milieu. Les verres C à la quantité exigüe de milieu prirent une couleur bleue plus forte que celle des verres B.

Les verres des différentes séries ont jauni aux époques suivantes: A. 5, 6, 8, 10, 11, 12, 12, 14, 14, 18, 20, 22, 23, 24, 24, 25, 29 et 38 jours. Un seul verre restait encore bleu au bout de 39 jours.

B. 21, 23, 25, 31, 32, 37, 38, 39, 42, 43, 43, 55, 65, 65, 70, 79 et 89 jours; 2 verres n'avaient pas encore jauni au bout de 90 jours.

C. 13 (14?), 15, 15, 17, 20, 20, 27, 37, 54, 55, 56, 58, 61 et 80 jours; 6 verres n'avaient pas encore jauni au bout de 90 jours.

D. Le contenu d'une des pipettes couchées jaunît au bout de 11 jours. On a terminé l'expérience au bout de 31 jours. Des 17 pipettes qui avaient marqué des tendances incertaines vers la mutation on a ensemencé sur plaque d'arabinose. Deux de celles-ci seulement (une de celles qui étaient resté couchées et une de celles dont avait tourné le bout fermé en haut) ont donné des colonies jaunes. Donc, on n'a constaté que 3 mutations certaines de cette série, mais il était plus difficile de juger du résultat que pour les expériences des tubes ordinaires.

Voici ce qu'une comparaison des 4 séries a permis de constater:

1. L'affusion du milieu avec de l'huile de paraffine entrave la mutabilité d'une manière considérable, vraisemblablement comme suite des conditions moins aérobies de la série B.

2. Les tubes de la série C mutent, à tout prendre, presque aussi vite que les verres de la série B, bien que le volume n'en soit que d'un dixième. Pendant le premier temps la série C mute même plus souvent que la série B, tandis que plus tard la proportion est renversée. Vraisemblablement c'est l'oxydation meilleure dans la petite quantité de milieu, qui, en chiffres ronds, décuple la fréquence de la mutation, ce qui compense l'effet de la diminution du volume. En tenant compte de la quantité de milieu, la mutabilité de la série C est même plus grande que celle de la série A. C'est ainsi que la fréquence de mutation de la série C pendant les 20 premiers jours est de 0,3; à ceci répondrait que, dans la série A elle serait de $1 - 0,7^{10} = 0,97$, tandis qu'elle est seulement de 0,6.

3. Dans les pipettes de 0,25 c. c. on a constaté, au cours de 31 jours, une fréquence de mutation de $\frac{3}{49} = 0,06$. Ceci répondrait, dans un volume de 2 c. c., à une fréquence de mutation de $1 - \left(\frac{46}{49}\right)^8 = 0,40$; à cette époque la fréquence est de 0,90 pour la série A, et de 0,21 pour la série B. Donc, dans les pipettes Pasteur les conditions de mutation étaient décidément moins bonnes que dans les tubes sans huile de

paraffine, tandis qu'elles paraissaient un peu meilleures que dans les tubes à huile de paraffine. Au cours de 31 jours on a constaté dans la série C une fréquence de mutation de 0,35, tandis que dans la série D elle n'était que de 0,06, bien que le volume fût un peu plus grand.

II. De la même manière que pour la série d'expériences I on a ensemencé 73 tubes mesurant 8,0—8,5 mm de diamètre intérieur et contenant 2,1 c. c. de milieu (hauteur de liquide: un peu moins de 4 cm.) de même que 115 tubes de verre de Pyrex, mesurant 1,9 mm de diamètre intérieur, ici la longueur de la colonne liquide variait entre 42 et 58 mm. *

57 tubes ont été placés le bout fermé en haut, 58 tubes le bout ouvert en haut. Au bout de 8 jours les bouts ouverts ont été fermés avec de l'huile de paraffine pour empêcher une évaporation continue. Parmi les verres placés le bout fermé tourné en haut, 3 ont jauni respectivement le 14^e, le 20^e, et le 29^e jour; parmi les verres placés le bout ouvert tourné en haut 5 ont jauni respectivement le 25^e, le 30^e, le 48^e, le 53^e et le 56^e jour. L'observation des autres verres a été continuée jusqu' à 120 jours après l'ensemencement. Comme la masse principale de la culture s'abaisse peu à peu vers le fond, elle va s'assembler, dans le groupe de verres cité le premier, tout près de la surface libre du liquide, donc sous les conditions les plus aérobies, dans l'autre groupe dans le fond du verre, donc sous les conditions les plus anaérobies; il faut pourtant remarquer que la partie de la culture qui se dépose doit se composer de bactéries immobiles, probablement pour une grande partie morts. Il ressort cependant des expériences des tubes ordinaires qu'une grande partie des mutations se produit parmi les bactéries déposées, le jaunissement commençant souvent juste au fond de verre. Au bout de 120 jours on a vidé de leur contenu 52 des microtubes qui avaient été placés le bout ouvert tourné en haut, et de 53 des microtubes qui avaient été placés le bout fermé en haut. La culture de ceux-là se montrait beaucoup moins claire que la culture de ceux-ci. En conséquence on a trouvé par énumération vitale (dilution et semences d'une quantité mesurée sur plaque) respectivement $9,4 \cdot 10^6$ et $2,76 \cdot 10^6$ bactéries par centimètre cube. Il en ressort que les cultures étaient loin d'être éteintes après 4 mois de repos à 37°, bien qu'on n'ait pas observé de mutations visibles pendant les deux derniers mois.

Le nombre de cultures mutées dans les deux groupes

de tubes est trop restreint pour pouvoir en tirer quelque déduction quant au groupe dans lequel les conditions de mutabilité sont les plus favorables. Par contre on peut soutenir nettement — abstraction faite de la possibilité de mutations qui ne se sont pas manifestées visiblement — que les conditions de mutabilité étaient moins bonnes dans les tubes étroits que dans les tubes ordinaires. En effet ceux-ci s'étaient tous teints en jaune au bout de 53 jours, tandis que, comme on vient de le citer, à des époques beaucoup plus tardives, aucune mutation n'avait été observée que dans 8 des tubes étroits. En appliquant le calcul habituel on trouve que ceci répondrait à ce que 31 p. c. des cultures de tube ordinaire n'auraient pas muté.

V. *Microméthode de fermentation.*

Selon nos expériences la microméthode de fermentation dans des tubes étroits n'a donc pas donné d'aussi bons résultats que dans les mains de *Schmit-Jensen*, sans que nous voyions à même de décider ce qui cause la différence (caractère divergeant de milieu de base, clôture des verres avec de l'huile de paraffine dans nos expériences faites avec les verres de Pyrex?). Conformément aux résultats de *Christiansen* nous avons trouvé que l'anaérobiose partielle causée par l'affusion de paraffine a considérablement entravé la mutabilité; ceci s'est manifesté uniquement dans une faible mesure, quand on s'est servi d'un petit volume de milieu en tubes; on a indiqué ici une microméthode de fermentation, très facile à improviser et donc probablement utile dans les cas où on a à faire, par occasion, des réactions de fermentation avec une toute petite quantité de milieu.

Il est extrêmement vraisemblable que cette méthode très simple a déjà été employée, mais, n'en ayant rien pu trouver dans la littérature, je vais communiquer une série d'expériences entreprises pour vérifier en détail son utilité.

Une culture sur milieu solide, provenant de chacun des types de bactéries cités dans le tableau 6, a été ensemencée dans les 12 sucres indiquées. Le milieu de base était le Ex. b avec une concentration de bleu de bromothymol à environ 1 : 40.000 dans les macrotubes, et à environ 1 : 15.000 dans les microtubes. Tous les tubes employés étaient des verres de Jena. Pour la macrométhode on s'est servi de verres des dimensions suivantes:

mannite et glucose:	11 mm de diamètre,	hauteur de couche de milieu:	4—4,5 cm.
tréhalose:	13 " " " " " "	" " " " "	1,5 cm.
lactose et sac-			
charose:	8—9 " " " " " "	" " " " "	5 cm.
les autres sucres:	8—9 " " " " " "	" " " " "	3—4 cm.

Pour la microméthode on s'est servi de verres de 8—9 mm de diamètre, 3 gouttes (= 0,12 c. c. environ) de milieu, enduit d'une couche d'huile de paraffine d'une hauteur de 1 cm. Le milieu a pris la forme d'une lentille concavo-convexe.

On voit que la microméthode vaut complètement la macrométhode pour toutes les souches analysées, exception faite des streptocoques du groupe A et B; pour le streptococcus salivarius c'est difficile d'apprécier les résultats à cause des réactions faibles.

Les macroverres de mannite et de glucose étaient pourvus d'un verre intérieur pour l'examen du dégagement gazeux; le bac. paratyphique A, le bac. paratyphique B et le bac. typhi murium ont dégagé du gaz (de 2/5—3/4 du volume du petit verre). Par la microméthode de fermentation on n'a pas pu observer le dégagement gazeux. Cependant, ce défaut de la méthode n'est pas décisif, puisque, pour des fins diagnostiques ordinaires, il suffira d'examiner si un bac-térie dégage du gaz par la fermentation, tandis que c'est d'un intérêt secondaire d'établir si c'est là le cas pour tous les sucres fermentés.

Si on a l'intention d'appliquer la microméthode pour les réactions fermentatives des sucres coûteux, il faut en contrôler d'abord, par des expériences avec les sucres moins coûteux, l'utilité pour les souches ou le groupe de bactéries qu'on a à examiner.

Tableau 6.

	Dul- cite	Man- nite	Sor- bite	Arabi- nose	Xy- lose	Rham- nose	Gluc- cose	Lac- tose	Mal- tose	Sac- cha- rose	Tré- ha- lose	Sali- cine
<i>Salm. typhi</i> I, Macromét.	014	+1	+1	014	+1	014	+1	014	+	014	+1	014
» » Micromét.	+18	+1	+1	014	+1	014	+1	014	+1	014	+1	014
<i>Salm. typhi</i> II, Macromét.	014	+1	+1	014	014	014	+1	014	+1	014	+1	014
» » Micromét.	+12	+1	+1	014	014	014	+1	014	+1	014	+1	014
<i>Salm. paratyphi</i> A, Macromét.	+2	+1	+1	+1	014	+1	+1	014	+1	014	+1	014
» » Micromét.	+1	+1	+1	+1	014	+1	+1	014	+1	014	+1	014
<i>Salm. paratyphi</i> B ¹⁾ , Macromét.	014	+1	+1	+1	+1	+1	+1	014	+1	014	+1	014
» » Micromét.	014	+1	+1	+1	+1	+1	+1	014	+1	014	+1	014
<i>Salm. typhi murium</i> , Macromét.	+1	+1	+1	+1	+1	014	+1	014	+1	014	+1	014
» » Micromét.	+1	+1	+1	+1	+1	014	+1	014	+1	014	+1	014
<i>Bac. dysent. Sonne</i> , Macromét.	014	+1	014	+1		+1	+1	(+) ¹²	+0	(+) ¹²	+1	014
» » Micromét.	014	+1	014	+1	014	+1	+1	(+) ¹⁸	+8	(+) ¹²	+1	014
<i>Streptocoque A</i> ²⁾ , Macromét.	014	014	014	(+) ³	014	014	+1	+1	+1	(+) ¹²	+1	+1
» » Micromét.	014	014	014	014	(+) ⁸	014	(+) ³	(+) ⁴	014	(+) ⁴	(+) ⁴	014
<i>Streptocoque B</i> ²⁾ , Macromét.	014	014	014	014	014	014	+1	+1	+1	+1	+1	+2
» » Micromét.	014	014	014	014	014	014	+1	+1	+1	+1	+8	014
<i>Streptococcus faecalis</i> , Macromét.	014	+1	+1	014	+4	014	+1	+1	+1	+2	+1	+1
» » Micromét.	014	+1	+1	014	+4	014	+1	+2	+1	+2	+1	+1
<i>Streptococcus salivarius</i> ³⁾ , Macromét.	014	(+) ¹²	014	014	014	014	(+) ¹⁸	014	014	(+) ⁸	(+) ¹²	014
» » Micromét.	014	(+) ⁴	014	014	014	014	014	014	014	(+) ⁴	(+) ⁴	(+) ⁴

¹⁾ Une des souches rares ne fermentant pas la dulcité.

²⁾ Groupement de Lancefield.

³⁾ Croissance faible dans tous les tubes.

+: Jaunissement complet au date indiqué.

» imparfait » » »

(+): Jaunissement complet au date indiquée.

» imparfait » » »

sans qu'il y eut jaunissement complet au cours des 14 jours.

VI. Fermentation primaire de xylose par le bacille typhique; mutation primaire.

Comme il ressort, entre autres choses, de l'étude de *Kristensen et Henriksen* de 1926 et de celle de *Kristensen* de 1938 on peut diviser le bacille typhique en 2 types, dont l'un (type I) fait fermenter la xylose de manière typique, tandis que l'autre (type II) ne fait pas fermenter la xylose pendant les 24 premières heures, tout au moins pas de manière évidente. Le caractère typique établi ainsi par une lecture après 24 heures se maintient très constant tant in vivo que par culture sur des milieux ordinaires; mais par un temps de culture plus long dans un milieu contenant de la xylose, le type II va le plus souvent muter envers la xylose, en produisant assez d'acide pour un jaunissement complet du bleu de bromothymol.

Pour mieux connaître cette fermentation mutative de xylose on a choisi, au mois d'août 1939, les 8 souches typhiques du type II, inscrites dans le tableau 7. La conservation de ces souches a été faite dans de la gélose à extrait de viande et peptone. Les expériences qu'on va rapporter ici, ont été terminées au mois d'octobre 1941.

Tableau 7.
Souches de Salmonella typhi, Type II.

Numéro d'ordre	Numéro original	Date de l'échantillon	Commencement de la maladie	Domicile du malade
1.	F 1840/36—37	5. VI. 36	21. V. 36	Iles Féroë.
2.	F 4727/36—37	6. VIII. 36	1909	
3.	F 117/37—38	4. IV. 37	10. II. 37	
4.	F 1985/37—38	17. VI. 37	1912	Différentes localités de Jutlande et Fionie.
5.	F 6990/37—38	22. IX. 37	2. IX. 37	
6.	W 10459/37—38	24. III. 38	13. III. 38	
7.	F 511/39—40	19. IV. 39	1918	
8.	F 4223/39—40	5. VIII. 39	15. IX. 29	

F = Fèces, W = échantillon pour la réaction de Widal; culture du caillot.

Les cultures pures employées pour les expériences ont été produites partie par des semences d'une seule colonie, partie par la culture »unicellulaire« selon la méthode d'Ørskov. Les différents phénomènes mutatifs qu'on va décrire, se sont manifestés de la même manière, soit qu'on ait employé une culture pure ordinaire, ou une culture »unicellulaire«. D'ailleurs on a contrôlé dans une large mesure que les cultures mutées et nonmutées, dont on s'est servi pour les expériences particulières, étaient des cultures pures de bacilles typhiques, ayant fait soit une agglutination sur lame avec les sérums O, Vi et H soit des réactions de fermentation dans une série de sucres.

Pour l'examen des souches d'un milieu liquide on a employé l'Ex B avec du bleu de bromothymol et $\frac{1}{2}$ % de xylose (Merck), si rien d'autre n'est indiqué. Pour l'examen sur milieu solide, ayant trait à la fermentation mutative l'Ex B ne s'est pas trouvé approprié comme milieu de base, les mutants ne donnant souvent aucun jaunissement sur la gélose, qui en a été produite, même s'ils ont donné un jaunissement marqué dans le milieu liquide. Pour trouver un milieu solide plus sensible on a donc fait des expériences comparées avec 17 milieux de base, additionnés de xylose et de bleu de bromothymol. Il s'est manifesté par là que l'acidification chez les mutants caractérisés s'est accusée d'une manière particulièrement nette sur plaque d'un contenu de $\frac{1}{2}$ % ou de 1 % de peptone Parke-Davis (sans extrait de viande; l'addition de $\frac{1}{2}$ % d'extrait de viande à 1 % de peptone Parke-Davis n'a pas amélioré le milieu) et encore plus sur gélose Bactotryptose; cependant, ce milieu contenant 1 ‰ de glucose, on ne s'en est servi que pour des expériences particulières, tandis qu'on s'est servi généralement de gélose à $\frac{1}{2}$ % peptone Parke-Davis, $\frac{1}{2}$ % de NaCl, 1 % de xylose et du bleu de bromothymol à la concentration ordinaire, $p_H = e. 7,3$. La couleur en était bleue.

On a ou additionné la xylose aux différents milieux stériles, solides et liquides, en forme d'une forte solution aqueuse stérilisée par filtration, ou on a fait bouillir le milieu

pendant 10 minutes après l'addition de la xylose, sans que ceci ait produit une différence essentielle; cependant il est possible de constater (tant par des essais de réduction que par observation de la couleur de bleu de bromothymol) une dissociation peu considérable de la xylose par l'ébullition de 10 minutes. Pour les expériences où c'est d'une importance particulière que la xylose ne se dissocie pas, on a donc employé la xylose filtrée sans chauffage du milieu après son addition.

Nous allons très sommairement faire l'exposé des particularités des souches comme elles ressortent des examens réitérés: En ensemençant les souches 3—8, provenant de cultures qui antérieurement n'étaient pas entrées en contact avec la xylose, sur des plaques de xylose, la végétation consistait en de petites colonies verdâtres et plates. La croissance en était entravée d'une manière prononcée comparée à la croissance du même milieu de base sans xylose. Mais très vite—quelquefois même au bout de 24 heures — et généralement au bout de 48 heures — il s'est produit, dans un nombre plus ou moins grand de ces colonies, des bourgeons d'un bleu blanchâtre, qui devenaient rapidement plus grands que la colonie mère. Evidemment il s'agissait d'un phénomène mutatif. Le mutant bleu blanchâtre n'avait été ni entravé ni favorisé par la xylose, poussant de la même manière sur un milieu contenant du xylose et un milieu exempt de xylose, de même la forme verte et la forme bleue blanchâtre croissaient de manière égale sur un milieu exempt de xylose.

Ainsi la forme de mutation dont nous venons de parler relève de ce que l'entrave primitive est surmontée, donc le même phénomène que *Reiner Müller* a démontré en 1908 au sujet de la rhamnose, où il apparaît cependant d'une manière encore plus prononcée. Sur le milieu contenant de la xylose la forme primitive paraît posséder, à juger d'après la couleur verdâtre, une capacité faible de fermentation, faisant défaut chez le mutant.

Donc, on a observé ces deux faits paradoxaux: 1) la forme

primitive paraît posséder une certaine capacité de fermentation bien que faible, mais elle est fortement entravée par la xylose, tandis que d'ordinaire il est de règle qu'une culture qui fait fermenter une espèce du sucre soit favorisée dans sa croissance par la présence même de ce sucre; 2) la mutation décrite consiste non seulement en la suppression de l'entrave, mais encore en ce que la capacité fermentative primitive disparaît.

La croissance entravée et l'acidification faible de la culture primitive se manifestent aussi dans le milieu liquide contenant de la xylose (et pour la xylose de Merck et pour celle de Pfanstiehl; au bout de deux ou trois jours l'entrave se réduit en raison de l'apparition de la forme non-entravée. Si, à une époque appropriée, on dissémine sur plaque à xylose, une culture en milieu liquide à xylose, on verra paraître un mélange de la forme primitive verdâtre et entravée (produisant ensuite des bourgeons bleus blanchâtres) et la forme non-entravée bleue blanchâtre.

Pour la souche 2 l'acidification primaire était le plus souvent plus forte que pour numéros 3—8; elle se produisait encore plus fortement pour le numéro 1; cela tient certainement à cette capacité de fermentation que l'entrave primitive se réduisait vite ou faisait complètement défaut.

Particulièrement pour le numéro 1, les colonies, en 3 ou 4 jours, devenaient assez grandes, bombées, vert-jaunes ou complètement jaunes. D'ailleurs le degré de l'acidification chez les numéros 1 et 2 variait un peu à des expériences répétées; en somme on a eu l'impression qu'il s'agissait, au fond, de la même capacité de fermentation que nous avons constatée pour les souches 3—8, mais à un degré particulièrement haut. La faculté primaire de fermentation relativement forte paraît propre aux souches typhiques des îles Féroé (comp. *Kristensen*, 1938, p. 690, en bas). Aux disséminations du numéro 2 sur plaque de xylose on a vu paraître comme pour les numéros 3—8 des bourgeons bleus blanchâtres, mais non pas pour le numéro 1, probablement c'est l'acidification relativement forte qui entrave la capacité de mutation; par la culture dans un milieu de xylose liquide, où l'acidification

est faible, le numéro 1 pouvait aussi produire la forme bleue blanchâtre.

On peut discuter la question à savoir si cette forme bleue blanchâtre est identique à la forme mutative »grise« décrite par *Kristensen et Henriksen* (p. 571—572) qui, il est vrai, se distinguait de la forme primitive par une certaine capacité de fermentation de xylose, se manifestant surtout à une chaleur tempérée; on n'a pu constater rien d'analogue pour la forme bleue blanchâtre, décrite dans l'étude présente, qui justement, au contraire de la forme primitive, paraît dépourvue de la capacité de fermentation de la xylose. En général, par une série d'expériences de culture des souches employées dans l'étude présente sur des milieux de xylose liquides et solides, tant à 37° qu'à 22°, on n'a observé aucun cas où l'acidification fut le plus vive par la température basse. Il est impossible de dire, si la différence entre les observations anciennes et les observations nouvelles tient aux conditions des expériences ou au caractère des mutants.

Et la forme verte et la forme bleue blanchâtre sont très constantes, chacune des formes restant invariable sous la culture tant en Ex B + dulcite en tubes sans mutation pendant 3 mois, sous la culture successive dans une série de sucres différents (mannite, sorbite, maltose, tréhalose, glucose) que sous une série de cultures en bouillon, interrompues par 3 disséminations sur plaque *Conradi-Drigalski* modifiée.

Non seulement la forme verte, mais encore la forme bleue blanchâtre peuvent pourtant se présenter sous un aspect un peu différent chez les diverses souches. En outre on a observé chez telle et telle souche des variations différentes de l'aspect des colonies chez la forme primairement mutée sans aucune acquisition certaine de capacité de fermentation. Quant à l'apparition des mutants *fermentants* nous renvoyons le lecteur à un mémoire suivant.

Pour examiner de plus près la question de savoir si l'acidification primaire faible est due réellement à une fermentation de xylose on a fait les expériences suivantes:

1. Dissémination sur le milieu bacto-tryptose sus-dit avec et sans 1 % de xylose. D'une culture de gélose provenant de chacune des 8 souches on aensemencé une petite partie d'une

plaque de tryptose-gélose + bleu de bromothymol et une plaque correspondant de xylose. Sur le milieu sans xylose quelques souches ont produit un jaunissement tout à fait faible, sur le milieu avec xylose elles ont toutes produit un jaunissement de beaucoup plus fort. Pour cette expérience on a employé de la xylose stérilisée par une ébullition de 10 minutes dans une solution aqueuse. Ultérieurement on a fait une expérience avec de la xylose, filtrée et non-chauffée; pour ceci on a employé 5 des souches (culture « unicellulaire » des numéros 2, 5, 6, 7 et 8) de manière que l'expérience soit faite et avec la forme verte et avec la forme bleue blanchâtre. Les 10 cultures se sont développées en bleu sur le milieu sans xylose, sur le milieu contenant de la xylose la forme verte du numéro 5 s'est développée en une couleur jaune intense, la forme bleue blanchâtre du numéro 5 avec un faible jaunissement; pour les 4 autres souches la forme verte s'est développé sur le milieu contenant de la xylose avec une couleur jaune faible, tandis que la forme bleue blanchâtre croissait sans jaunissement. De ces expériences il ressort que la forme primitive peut produire de l'acide de la xylose, tandis que pour la forme bleue blanchâtre ceci ne se produit pas ou seulement à un degré plus faible.

2. En égard à la possibilité que la faible acidification de la forme verte puisse provenir de ce que d'autres substances que des acides soient formées par la fermentation, toutes les souches, sauf les numéros 3 et 4, ont été ensemencées dans du milieu de xylose liquide où, au lieu du bleu de bromothymol, on avait employé de la fuchsine, décolorée par du sulfite de sodium; cet indicateur réagit surtout envers la formation d'aldéhyde et donne en bien des cas d'autres résultats que le bleu de bromothymol. Pour quelquesunes des souches il s'est produit, il est vrai, en quelques jours une forte coloration rouge, mais celle-ci pouvait s'expliquer par l'apparition de mutants fermentants et ne fournit donc aucun éclaircissement sur la capacité de fermentation de la forme primitive.

3. La capacité d'utiliser la xylose sur milieu synthétique a été examiné pour la forme verte et pour la forme bleue blanchâtre. Comme démontré par *Fildes*, *Gladstone* et *Knight* et par *Burrows* le bacille typhique peut croître sur milieu de sel d'ammonium et

une faible quantité de tryptophane comme seule source d'azote, surtout quand on y additionne aussi une substance sulfureuse, p. ex. le sulfure de sodium. Sur la base de quelques expériences faites seulement à titre de renseignement on a choisi un milieu de gélose à 0,1 % de phosphate d'ammonium, 0,1 % de phosphate secondaire de potassium, 0,02 % de sulfate de magnésium cristallisé, 0,5 % de chlorure de sodium, 0,002 % de tryptophane et 0,01 % de thiosulfate de sodium. Par des expériences avec les souches typhiques 2 et 4 on a pu entretenir sur ce milieu une culture assez satisfaisante dans 4 générations en y additionnant encore $\frac{1}{2}$ % de glucose, de maltose, de mannite ou de sorbite. Dans une expérience nouvelle on a cultivé tant la forme verte que la forme bleue blanchâtre des souches 2, 4, 5, 6, 7 et 8 dans 3 générations sur le milieu synthétique avec glucose; cependant, en réensemencant de là sur le même milieu avec xylose au lieu de glucose aucune culture n'a paru dans aucun cas. Ainsi la capacité d'utilisation de xylose est trop faible pour qu'il ait pu se manifester sur le milieu synthétique.

4. Enfin, par une expérience de réduction on a essayé de déterminer combien de xylose la forme verte et la forme bleue blanchâtre consomment par culture dans un milieu contenant de la xylose. Pour l'épreuve de réduction on a suivi la méthode de *Hagedorn-Jensen*, modifiée par *Schmidt*. On a fait un grand nombre d'essais pour se familiariser avec la méthodologie, entre autres choses on a examiné s'il faut enlever les bactéries par centrifugation avant le titrage. Il s'est trouvé que la présence des bacilles typhiques dans une jeune culture (âgée de 24 heures) diminue tout au plus la consommation de la solution de thiosulfate de sodium (voir ci-dessous) de 0,1 c. c. par 0,4 c. c. de culture; la seule évaporation consécutive à la centrifugation et au transvasement pourra aboutir à une erreur tout au moins aussi grande.

Pour l'expérience principale on a employé comme milieu une solution à 2 % de bacto-peptone et à $\frac{1}{2}$ % d'un composé de phosphate de potassium primaire et secondaire, partie sans addition ultérieure, partie avec 0,4 % de xylose (stérilisé par filtration). On aensemencé le milieu contenant la xylose partie avec la forme verte, partie avec la forme bleue blanchâtre des souches typhiques, désignées dans le tableau 8 (cultures »unicellulaires«). Après 2 jours d'incubation on a

ensemencé sur plaque de xylose; là-dessus on a tué les cultures en les chauffant pendant 5 minutes jusqu'à 70°; sans secouer la partie de la culture déposée on a transvasé de chaque culture, à l'aide d'une pipette, 3 portions de 0,4 c. c. chacune dans les grands tubes, où devait s'opérer le titrage. Pour les soumettre à une comparaison, on a titré et le milieu de xylose non-ensemencé et le milieu de base non-ensemencé; on a laissé séjourner les tubes non-ensemencés de même que les tubes ensemencés pendant 2 jours à 37°, et on leur a fait subir un chauffage égal, pour faciliter le plus possible les comparaisons des résultats.

Le tableau 8 indique la consommation de $\frac{n}{200}$ de thiosulfate de sodium en c. c. 1 c. c. correspond à 0,18 mg de xylose environ. La valeur à blanc — qui d'ailleurs n'entre pas dans les calculs établis ci-dessous — était, d'après des expériences antérieures, de 12,5 c.; le milieu de base a donc donné une réduction correspondant à un peu plus de 2 c. c. de la solution de thiosulfate de sodium. Les titrages indiqués à la même ligne horizontale ont été faits en même temps.

Dans les cultures sur plaque de xylose, provenant des cultures bleues blanchâtres des numéros 5 et 6, a paru, à côté des colonies bleues blanchâtres, un nombre restreint de colonies jaunes, donc, un mutant fermentant avait paru déjà pendant les deux jours de culture. Ceci explique les valeurs particulièrement hautes de c et de c-a, et les valeurs particulièrement basses de b-c pour ces deux souches. Nous avons mis ces valeurs entre parenthèses pour indiquer qu'il faut les laisser de côté en jugeant le résultat de l'expérience. Les 4 autres cultures bleues blanchâtres ont donné exclusivement des colonies bleues blanchâtres; parmi les cultures vertes le no. 1 a donné des colonies vertes et quelques colonies bleues blanchâtres, les numéros 2 et 7 un composé plus égal des deux sortes de colonies, et les numéros 5, 6 et 8 seulement des colonies bleues blanchâtres. Ainsi, pendant les deux jours de culture, il s'est produit une quantité considérable de la forme bleue blanchâtre, mais cependant la forme verte a eu

Tableau 8.

Souche no.	Milieu basal	Milieu à xylose non ensemencé			culture verte			culture bleue blanchâtre			Consommation de xylose par la culture:	ver-te — bleue blanch.				
		a ₁	a ₂	a ₃	b ₁	b ₂	b ₃	b	c ₁	c ₂		c ₃	c	verte b-a	bleue blanch. c-a	b-c
1	10,2	1,15	1,05	1,15	1,12	1,3	1,2	1,4	1,30	1,1	1,05	1,15	1,10	0,18	-0,02	0,20
2	10,15	1,2	1,2	1,2	1,20	1,6	1,6	1,6	1,60	1,1	1,05	1,15	1,10	0,40	-0,10	0,50
5	10,45	1,2	1,35	1,3	1,28	1,4	1,4	1,25	1,35	(1,45	1,35	1,4	1,40	0,07	(0,12	-0,05
6	10,45	1,2	1,15	1,15	1,17		1,4	1,4	1,40	1,4	1,5	1,3	1,40	0,23	0,23	0,00
7	10,2	1,0	1,1	1,15	1,10	1,25	1,35	1,2	1,27	1,25	1,1	1,25	1,20	0,17	0,10	0,07
8	10,45	1,2	1,35	1,35	1,30	1,5	1,45	1,45	1,47	1,25	1,3	1,3	1,28	0,17	0,02	0,19

$$\frac{1}{3}(a_1+a_2+a_3)=a$$

$$\frac{1}{3}(b_1+b_2+b_3)=b$$

$$\frac{1}{3}(c_1+c_2+c_3)=c$$

la chance qu'il a été possible de lui donner pour manifester sa capacité de fermentation.

Il ressort du tableau que les cultures »vertes« avaient toutes une consommation de xylose positive (b-a), tandis que pour les cultures bleues blanchâtres la consommation de xylose (c-a) était tout près de 0. La réduction propre des bactéries ayant été incluse, dans le titrage, on devrait ajouter aux valeurs de b-a une petite inconnue (0,05—0,1?), et aux valeurs c-a et b-c probablement un chiffre encore plus petit, comme on ne peut pas supposer pour la culture verte entravée une réduction propre aussi grande que pour la culture non-entravée. Cependant, en laissant de côté cette correction, qui ne ferait que souligner la consommation de xylose de la forme verte il est possible de calculer l'écart quadratique moyen de b-a, c-a et b-c comme

$$\sqrt{[(1,15-1,05)^2 + (1,15-1,15)^2 + (1,05-1,15)^2 \dots] \cdot \frac{1}{52} \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{3} \cdot 2}$$

= ± 0,053. On peut donc considérer comme significatives les divergences de 0 constatées pour les valeurs de b-a et de b-c, exception faite de la valeur b-a pour la souche 5 et la valeur b-c pour la souche 7.

Comme valeur moyenne des 6 valeurs de b-a on trouve donc $0,20 \pm 0,022$

» » » » 4 » » c-a » » » $0,01 \pm 0,027$

» » » » 4 » » b-c » » » $0,19 \pm 0,027$

Ces valeurs moyennes de b-a et de b-c sont donc de beaucoup hors de la limite d'erreur; cependant il est à remarquer que les écarts moyens de ces valeurs moyennes ne sont valables que pour ces 6 cultures en particulier, mais non pas même pour les mêmes 6 souches à des expériences répétées, et encore moins pour les souches typiques du type II en général. Cependant, probablement on ne peut pas mettre en doute le résultat qualitatif: une fermentation faible de xylose comme caractéristique chez la forme primitive verte des bacilles typhiques du type II.

Pour convertir les centimètres cubes de la solution de thiosulfate de sodium en consommation de xylose exprimée en pourcentage de la quantité originelle de xylose, il faut multiplier par 11 environ. La consommation moyenne de

xylose par la forme verte n'était donc que 2 % environ de la quantité originelle.

Résumé.

1. Les particularités les plus importantes du cours de la mutation de la *Salmonella dublin* que nous avons décrites dans le mémoire précédent (vol. 17, p. 193) par l'examen d'une seule souche, se retrouvent aussi chez les 4 autres souches typiques de *Salmonella dublin*, mais seulement en partie chez 2 souches, atypiques au point de vue fermentatif.

2. Il est à supposer que la mutation fermentative ait pour règle que le logarithme de la fraction du nombre de réceptables de culture, dans lesquels, à une époque donné aucune mutation ne s'est produite, est proportionnel à la quantité de culture. Cependant ceci est seulement valable, si les conditions générales de culture sont comparables.

3. En se guidant d'après cette règle algébrique on a établi des comparaisons entre les expériences de mutation avec *Salmonella dublin* envers l'arabinose sous des conditions différentes de culture, partie sur la base d'expériences antérieures de *Schmit-Jensen*, partie sur la base d'expériences personnelles. Dans la plupart des cas on a trouvé la mutabilité plus grande dans les tubes ordinaires que sous des circonstances moins aérobies, p. ex. des tubes capillaires.

4. On a indiqué une méthode simple pour la mise en oeuvre des réactions de fermentation dans un volume de culture de 0,1 c. c. environ.

5. Le bacille typique du type de fermentation II possède primairement une capacité faible de fermentation de xylose. Par une mutation généralement survenue vite cette capacité de fermentation disparaît, peut-être, dans quelques cas, seulement en partie. La mutation provoquant une capacité de fermentation augmentée ne se produit généralement qu'à une époque ultérieure.

BIBLIOGRAPHIE.

- Burrows, W.*: J. Inf. Dis. vol. 64, p. 145 (1939).
- Christiansen, M.*: Oversigt over det kgl. danske Vidensk. Selsk. Forhandling 1912, no. 1.
- Fildes, P., G. P. Gladstone & B. C. J. G. Knight*: Brit. J. Exp. Path. vol. 14, p. 189 (1933).
- Kristensen, M.*: Journal of Hygiene vol. 38, p. 688 (1938).
- Acta Path. & Microb. Scand. vol. 17, p. 193 (1940).
- Kristensen, M. & Henriksen, H. C. Devantier*: Acta Path. et Microb. Scand. vol. 3, p. 551 (1926).
- Müller, Reiner*: Centralbl. f. Bakter. I. Abt. Ref. vol. 42, fasc. suppl. p. 57 (1908); Orig. vol. 58, p. 97 (1911).
- Schmidt, C. F.*: J. Bact. vol. 22, p. 31 (1931).
- Schmit-Jensen, H. O.*: Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles Aarskrift 1920, p. 87.

STUDIES ON HEREDITARY DWARFISM IN MICE. V.*)

INVESTIGATIONS OF THE TISSUE IN THE ISLETS OF LANGERHANS IN NORMAL MICE AND IN DWARFS.

By *Jorgen Grunnet.**)*

(Received for publication February 10th 1942).

For this investigation a strain of mice has been used with hereditary anterior pituitary dwarfism, the inheritance of which is recessive.

Previous studies on these dwarf mice aimed at investigating the influence of this anterior pituitary lobe defect on the other internally secernent organs, more particularly on the sexual glands, combined with various experiments of injection.

However, the investigations of the pancreas confined themselves to preliminary orientating investigations. Accordingly the object of this work is to examine thoroughly the insular tissue in the pancreas of these dwarf mice, with a special

*) Previous publication in this series:

- I. Acta path. et microbiol. scand. XIII, 512, 1936 & XIV, 197, 1937.
- II. Ibid. Suppl. XXXVII, 290, 1938.
- III. Ibid. XVIII, 20, 1941.
- IV. Ibid. XVIII, 169, 1941.

**) The author wishes to express his gratitude to Froken P. A. Brandt's Legat for a grant which made possible this investigation.

view to the influence of the anterior pituitary defect on this tissue.

As no weight-curve for this strain of dwarf mice, respectively, the normal animals of the same strain seems to have been produced previously, I have undertaken the elaboration of such a curve.

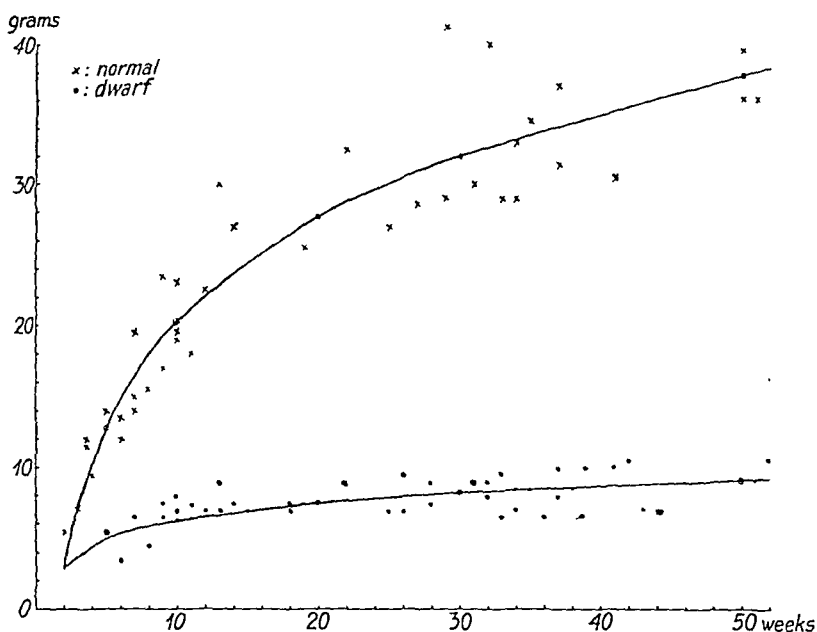


Fig. I.

The body weight of the normal mice and the dwarfs of the strain of mice.

My observations are entered into fig. I. This graphic illustration together with theoretical considerations give rise to the supposition that the equation of the weight-curve has the formula of $x = ay$, where x stands for the age in weeks, and y for the weight in grams, i. e. the curve is of an exponential character.

In order to examine this further it is delineated in a logarithmetical co-ordinate system, as has been done in fig. II, and there is seen to be accordance with the suppositions,

in so far as the points are distributed along both sides of a straight line.

Accordingly in producing the weight-curve, by the method of least squares, it is natural first to transform it into a straight line ($\log. x = a \times y$).

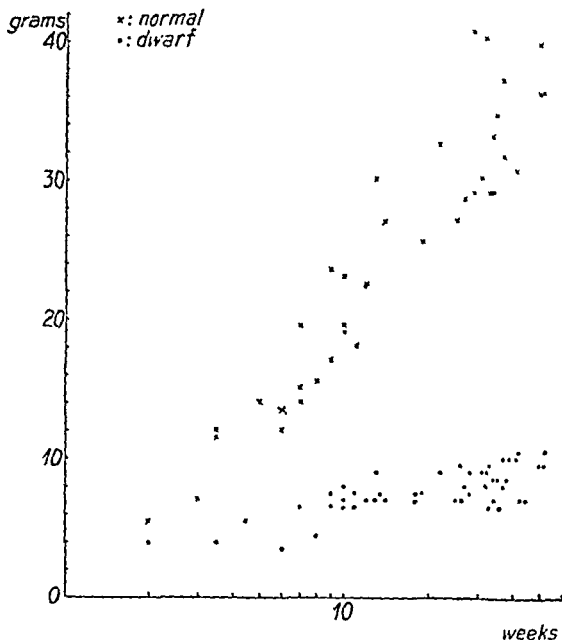


Fig. II.

The same observations as in fig. I delineated in a logarithmetical co-ordinate system.

Then the equation of regression is found: $y = 24.92 \times \log. x - 4.66$, (resp. $y = 4.18 \times \log. x + 2.05$).

Now this line is easily transformed into the usual co-ordinate system (the drawn curves of fig. I), and the equation is as follows: $x = 10^{\frac{y + 4.66}{24.92}}$ (resp. $x = 10^{\frac{y - 2.05}{4.18}}$).

By the aid of these curves it is possible to interpolate graphically, which means that it is possible to find for a given age the best estimate of the weight.

After the course of the weight-curves of the normal mice and the dwarf mice from their 2nd to their 52nd weeks of

life has been studied, it is examined how the weight of the pancreas stands in relation to these curves.

In fig. III the pancreas weight is compared with the body weight, with no regard to age, and it appears that there is a linear relation between these two weights, both as regards

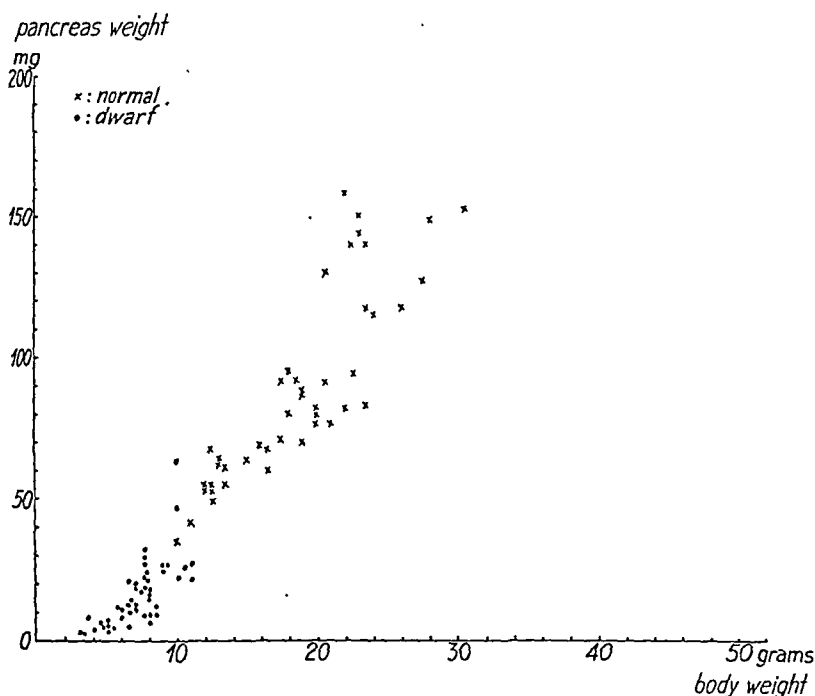


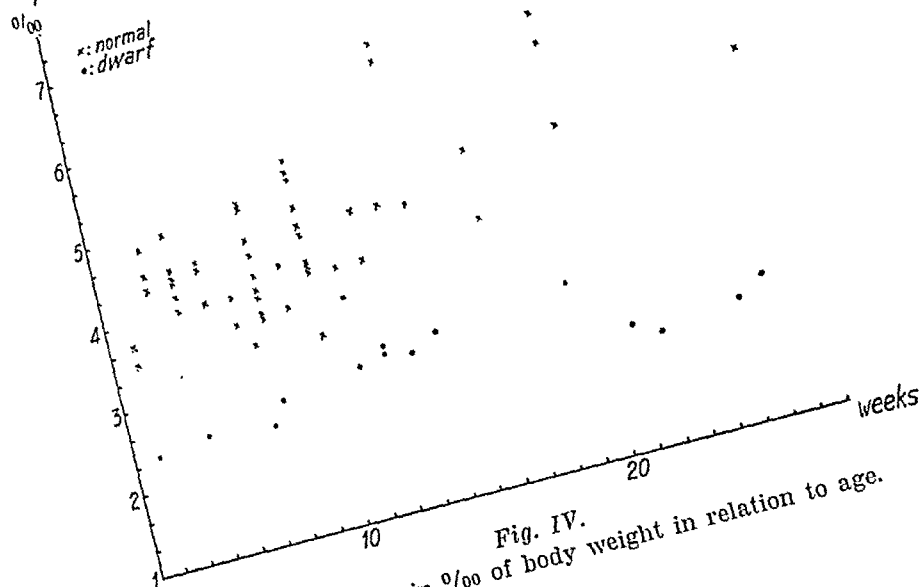
Fig. III.

The weight of pancreas in relation to the body weight, with no regard to age.

the normal mice and the dwarfs. Thus to an increase in the body weight corresponds an increase in the pancreas weight. This corresponds to what we should expect of an organ the secretion of which both externally and internally must bear a fair relation to the number of body cells, and also to what we should expect after having compared figs. I and V (see later).

Maybe there is a relative increase in the pancreas weight

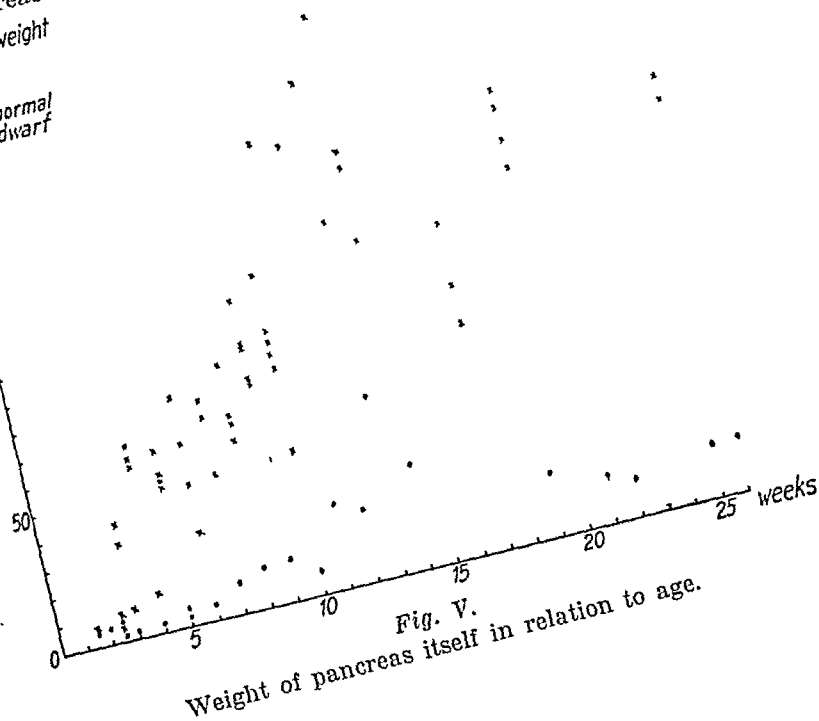
pancreas weight in relation to body weight



pancreas weight

mg
200
150
100
50
0

x: normal
•: dwarf



of the normal mice with a high body weight, (probably the oldest animals) — a fact which is seen more plainly in fig. IV, where the relation between pancreas weight and body weight is illustrated in proportion to the age.

Here the relation is constant in the case of the dwarfs, whereas the older normal animals show a slight increase in this relation.

The weight of the pancreas in relation to the age is illustrated in fig. V. The course of its weight-curve corresponds exactly to the curve illustrating the body weight.

In this place I shall mention the technique applied for the examination of the pancreas.

The only preparation required is to see that the animals have not been starved, because in case they have, the autodigestion asserts itself so strongly that the organ is destroyed quite or in part, before it has reached the fixation fluid.

When the animal has been killed, the pancreas must be taken out and fixed as quickly as possible.

The dissection of the pancreas must be undertaken with great care not to leave behind small bits of the gland, which in the mouse as in man has no capsule. The easiest way to make the dissection is — after having made an opening in the anterior abdominal wall and the peritoneum — to pull at the anterior pole of the spleen and thus draw out the tail of the pancreas. By means of scissors and tweezers the peritoneal folds are easily loosened; and finally a cut is made through the attachment to the duodenum, into which the pancreatic duct opens out. Parts of the head of the pancreas are apt to detach themselves and remain behind in the animal, a fact which naturally gives considerable errors in the results of the investigation.

By all the investigations of this work I advanced as follows: fixation in *Helly's* solution, cutting in complete serial sections, and staining in hematoxylin-eosin.

The measuring of the islets was made with ocular micrometer, which was each time adjusted with objective micrometer.

A good picture of the shape of the islets of Langerhans is attained by following them systematically in the preparations cut in serial sections, through all the sections in which they are seen. It is perceived that a few islets may branch out at one or at both ends, or they may narrow in, gradually to broaden again. But by far the greater number have the shape of a more or less regular

ellipsoid of revolution, which means that the majority of the sections seen are elliptic, oval, or circular.

If the shape deviates from the normal, the area of the islet in question is calculated separately; but in all other cases the following method is applied:

The largest and smallest diameter of each single islet is measured in μ . From the formula of $\pi \times a \times b$, where a and b represent one half of the largest and smallest diameter respectively, the area is calculated in μ^2 . The areas are added up and multiplied by 7μ (the thickness of the sections). The found number of μ^3 is converted into mm^3 , which, provided the specific gravity is 1, can be turned directly into mg.

The systematic examination of the insular tissue comprises dwarfs and corresponding normal siblings within the first 20 weeks.

More expeditious methods for the examination of the islets have been in consideration, thus f.i. the one reported by Hammar, or measuring of the islets in every 10 sections. As, however, these methods must be regarded as very unreliable, when applied to the pancreas, I have dropped them in favour of this more circumstantial and time-wasting, but also more reliable method.

The animals are not divided into groups according to age, as there is no difference in the different age classes, and as the material is spread equally over the first 20 weeks.

The concordant results show for all ages that the dwarfs have relatively more insular tissue in the pancreas than the corresponding normal animals.

As is shown in fig. VI the insular tissue constitutes in the dwarfs from 1.9 to 8.2 ‰ of the pancreas, and in the normal animals from 0.6 to 2.8 ‰ with average values of 3.8 and 1.75 ‰ respectively. The curve of the normal mice is indicative of an unvarying relation in all age classes, whereas the curve of the dwarfs seems to have the shape of a hyperbola, showing the highest values in the youngest individuals, and then gradually approaching a horizontal line.

In fig. VII the absolute amount of insular tissue (in gamma) is noted in relation to the age. Here the curve seems to rise smoothly, almost in a straight line. In fig. VIII the weight of the insular tissue is delineated in relation to the amount of pancreas tissue. This curve has the same course

insular tissue in ‰ of the pancreas

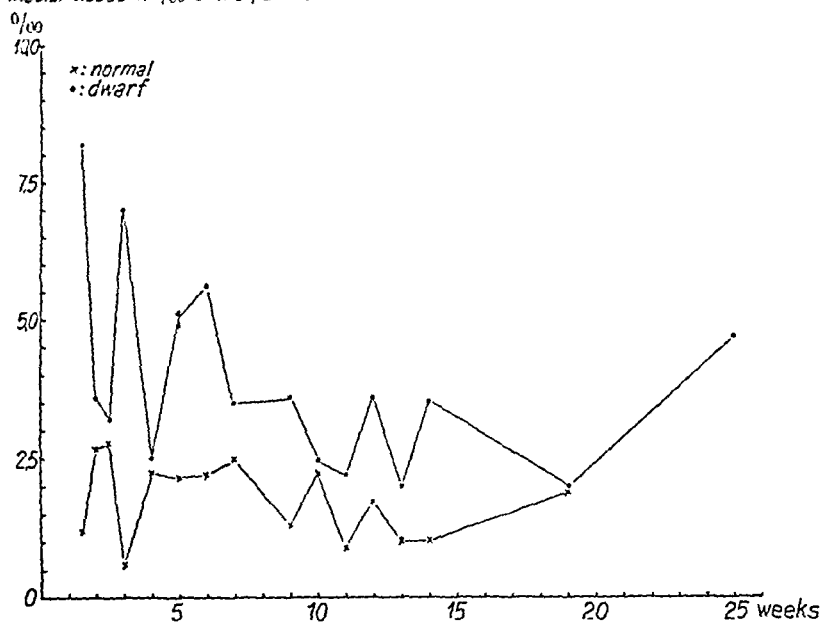


Fig. VI.

Insular tissue in ‰ of the pancreas in relation to age.

insular tissue

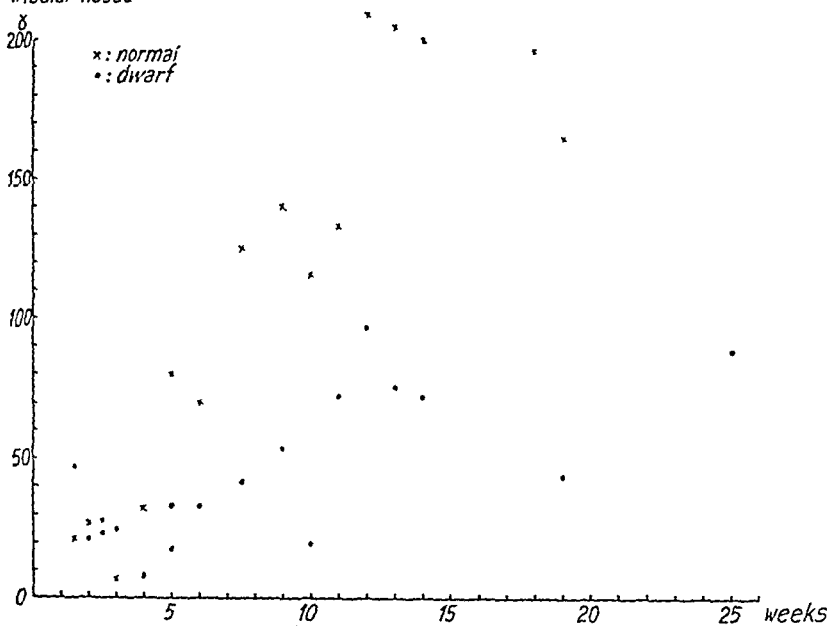


Fig. VII.

Insular tissue (in gamma) in relation to age.

as the weight-curve of fig. I, which is inserted as a dotted line.

Fig. IX shows the amount of insular tissue in relation to the body weight, and also in this case the curve of the dwarfs is the higher.

Thus it has been demonstrated that the anterior pituitary

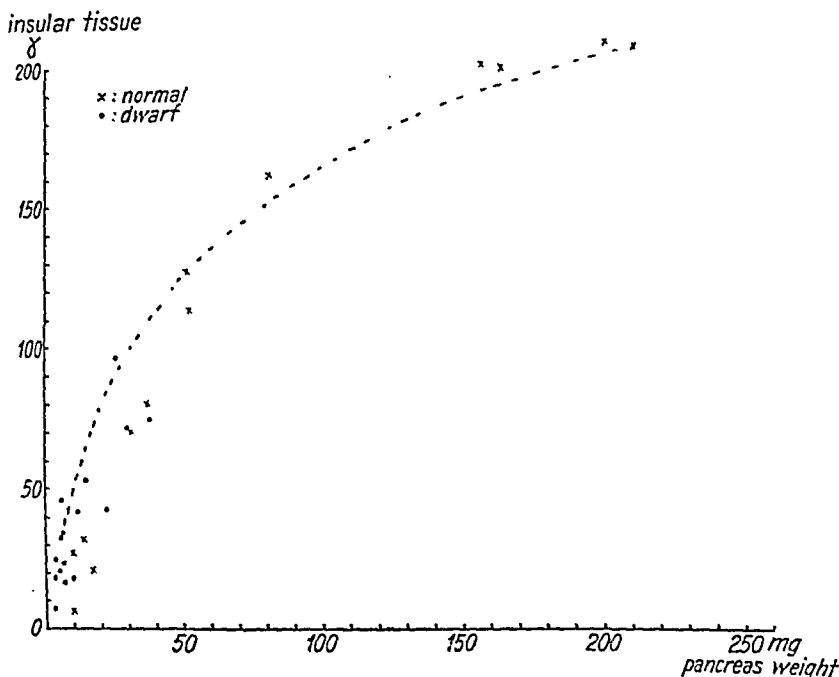


Fig. VIII.

Insular tissue (in gamma) in relation to pancreas tissue (in mg).

dwarfs have relatively more insular tissue than the corresponding normal mice, both in relation to the pancreas weight and in relation to the body weight.

The most obvious explanation of this fact, that the dwarf mice on account of their smaller size and consequent relatively larger surfaced should have relatively more insular tissue, is, however, not the right explanation as it appears from fig. IX. Because if the larger surface in the small mouse conditioned the greater development of insular tissue, we

should expect to find an almost equal amount of insular tissue in a small normal mouse of f. i. 9 g. and a large dwarf mouse of the same weight. But the curves show that the normal animal has 25 gamma and the dwarf 95 gamma of insular tissue.

Presumably the explanation is to be found in a difference

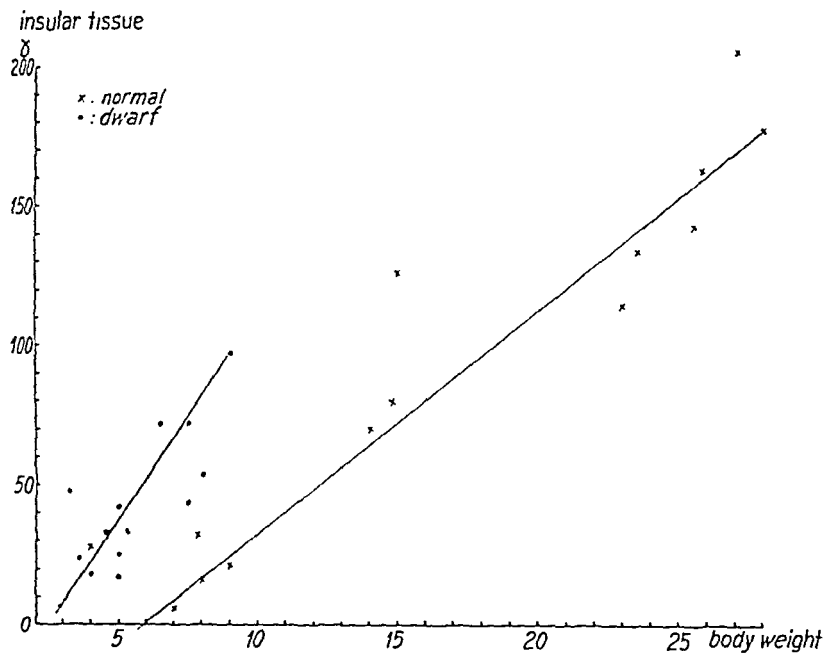


Fig. IX.

Insular tissue (in gamma) in relation to body weight (in g)
with no regard to age.

in hormonal influence from the superior centres in the pituitary gland.

The defect in the anterior pituitary lobe of the dwarf deprives this mouse of a number of hormones, among others such as regulate the carbohydrate metabolism.

Various investigators have found that mice with a destroyed anterior pituitary lobe are very sensitive to insulin. Accordingly it has been assumed that the anterior lobe secretes an anti-insulinary (diabetogenetic) hormone; and in

accordance with this Mollenbach has found that the dwarf mice get hypoglycemic cramps far earlier than the normal animals after insulin injection.

As my investigations have shown that the dwarfs have relatively more insular tissue, it may be that they permanently produce more insulin and consequently present lower blood sugar values, and that this is the reason why symptoms appear sooner in the dwarfs than in the normal mice after an additional supply of insulin. Mollenbach has also shown that there is far more glycogen deposited in the liver of dwarf mice than in that of normal mice. This accords well with the theory of an increased production of insulin.

In connection with Mollenbach's insulin experiments it was tried to make blood sugar determinations, for which the blood was collected after decapitation of the mouse, and its reducing power was determined by the method of Hagedorn and Norman-Jensen. However, this investigation gave no serviceable result, as the values were much too unequal. But I think we may presume from the insulin experiments mentioned above and the investigations reported in this work that the blood sugar value is low in the dwarfs.

Now it remains to be explained why the dwarfs have more insular tissue than normal mice.

Here I think we may imagine the existence of a hormone from the anterior pituitary lobe, which in the normal animal regulates (restricts) the development of insular tissue. In the dwarfs this hormone is lacking quite or in part, for which reason the insular tissue is more developed than in the normal mice.

Summary.

First a curve is presented illustrating the body weight of the normal animals and the dwarfs of the strain of mice (fig. I). The relation between the pancreas weight and the body weight is shown to be linear (fig. III). The technique

applied for the examination of the insular tissue is mentioned, and a systematic examination of all sections in each organ is carried through.

This examination shows that the dwarfs have relatively more insular tissue than the normal mice, both in relation to pancreas weight and in relation to body weight (figs. VI—IX).

This explains the greater sensitiveness to insulin noted in the dwarfs, as they must be presumed always to present lower blood sugar values.

Finally mention is made of the probability of a hormone from the anterior pituitary gland, which regulates (restricts) the insular tissue.

BIBLIOGRAPHY.

- Bjering, T.*: Hospitalstidende 81, 1938, 175.
Houssay, B. A. & Biosotti, A.: C. r. soc. biol. 113, 1933, 469.
Kemp, T.: Acta path. scand. Suppl. 16, 1933.
 — ibid. Suppl. 37, 1938.
 — Klin. Woch. 13, 1934, 1854.
Kemp, T. & Marx, L.: Acta path. scand. 13, 1936, 512.
 — — ibid. 14, 1937, 197.
Mollenbach, C. J.: Acta path. scand. 18, 1941, 169.

STREPTOBACILLUS MONILIFORMIS AND THE MORPHOLOGY OF ITS VARIANTS.

By *J. Ørskov.*

(Received for publication March 22nd 1912).

As regards most of the well-known bacteria we have long since established in broad outlines what may be characterized as the normal morphology; and if in our cultures we find form elements that differ greatly from the norm, we call these involutive, degenerative. The justification of this characterization lies in the fact that these deviating forms mostly prove to be less viable than the normal forms. For the sake of completeness, and in order to avoid misunderstanding, it should be mentioned that there are morphological deviations which cannot simply be called involutive.

If for example we observe the growth of a pneumococcus on a suitable solid medium, we find that in the first hours after planting the colonies contain nothing but relatively homogenous elements, all of which give growth of similar elements on being transplanted to a fresh medium. The older the colonies become, the more deviating forms will arise, and on transplanting from such colonies we find that only those that are normal in shape will grow, whereas the deviating forms have a very low germinative percentage, and the more deviating they are, the lower is the percentage. If on rare occasions a deviating element grows, it will generally soon give occasion to the growth of normal forms. After growing

for about two days the germinative ability will have fallen to the vicinity of zero, and this decreasing ability to grow, which coincides with abnormal morphology, we consider — and with full reason — as an expression of degeneration; it does not occur to us to credit the deviating forms with a place in the morphology of the pneumococcus just as important as that of the normal forms.

Exactly similar investigations and reflections must naturally apply when we are to consider the morphology of microorganisms that have been less well inquired into formerly and present peculiar difficulties of various kinds. Among these is the pleuropneumonia group, the micromyces group.

In earlier publications (1, 2 and 3) I described the morphology of these microorganisms, which in brief is as follows: The elementary, initial or terminal bodies are small round or oval, which to begin with grow out into an undivided, ramified branching mycelium, and this divides without demonstrable septa in the elementary bodies. The very often most bizarre forms appearing in the cultures are degenerative, involutive, and consequently foreign to the normal morphology. These variants have given occasion to the most remarkable speculations and analogy conclusions, and, particularly in recent years, newly found or newly described microorganisms have been placed within the pleuropneumonia group because of more or less superficial points of resemblance. Unfortunately, this is bound to give rise to criticism; but in the interests of truth it must be admitted that the difficulties involved in these investigations are very great, and criticism will not alter the fact that much admirable work in this field has been done, especially by *Emmy Klieneberger* (4), and that to a great extent it is due to her efforts that interest in the curious morphology of the streptobacillus has revived.

It is already some years since *E. Klieneberger* kindly sent me some of the L-forms of *Streptobacillus moniliformis* strains, and I then formed the impression, especially when studying the genesis of these L-forms, that it must surely be

a question of variation. One thing that was quite clear to me was that the alleged similarity between the L-forms and pleuropneumonia virus could not be less well founded. The growing interest in these morphological questions, and the constant reiteration of this claim as to similarity, persuaded me again to take the matter up for thorough examination.

The National Collection of Type Cultures with its usual readiness provided me with strains of *Streptobacillus moniliformis*, and I take this opportunity of renewing my thanks most cordially. Among these strains I made a particular study of one marked 4513.

There is no need to embark here on a description of the morphology of *Streptobacillus moniliformis* and the conditions governing the occurrence of L-forms. I shall merely say that my experience tallies with that of Dienes (5), in so far as like him I found that the L-forms often occur as secondary colonies with the characteristic tendency to grow downwards in solid media.

Method.

The media employed were broth-agar with various additions such as ascites fluid, ox or horse serum. Much use was made of semi-fluid agar with serum or ascites fluid added. The method employed was almost exclusively my direct agar method (6), which briefly is to examine the surface growth on solid, transparent media, from which after successive periods of growth dice are cut out and placed on a slide. Examination proceeds at various magnifications, commencing with the weakest dry lens and ending with oil-immersion, after the slide has been covered. Once again I have derived great advantage from the ideal illumination provided by the Leitz ortholux microscope. The examination is made as usual in a dark room with the exclusion of all disturbing light. For cultivation I chose a temperature of 32°, my impression being that growth is slightly slower and easier to observe than at 37°.

Let us begin our investigation at the time when, on a given medium, a secondary growth has appeared in some of the streptobacillus colonies, recognizable through direct agar-microscopy with a weak dry lens by dark, limited areas that are growing down into the medium.

If from such a culture we make a spread on a fresh medium, we shall often, with this strain, obtain growth of three different types of colony: 1. streptobacillus colonies, 2. much smaller colonies that are distinctly darker and dark right out to the edge of the colony, and 3. still smaller colonies of the kind characteristic of the L-forms, with a dense centre surrounded by a light zone.

In the following we shall designate the two latter types of colony as α and β colonies, bearing in mind that the latter are identical with *Klieneberger's* L_1 -colonies.

When the growth has been suitably spread it has been an advantage to isolate the last two types by means of a simple micromanipulator. Using low magnification the selected colony is circumscribed with a square, scratched with a sharp, bent-over needle. After the point of the needle has sunk down into the agar the scratches are produced by moving the stage under eye control. (The scratches must be so deep that they can be seen clearly by the eye in suitable illumination.) The slide with the agar cube is now removed, and, with the help of an inoculation needle, the point of which has been hammered and filed to the shape of a spear head, the square is carefully dug out of the agar and transferred to a fresh medium. This manipulation was best performed with the aid of a not too strong, screened spectacle lens (Zeiss). The cavity left after removing the square is examined microscopically in order to ensure that no other colonies have been touched than the one selected. In this manner it is comparatively easy to make sure of the purity of the initial material.

By means of transplanting in this manner from the α and β colonies to semi-fluid agar with serum or ascites we obtain a growth of sharply delimited, white colonies. After the isolated colonies have grown for a few days a more diffuse

growth in the media can be obtained by crushing the primary colony with a Pasteur pipette, whereafter a suitable spread can be made by blowing with the pipette.

On following the growth of the α colonies in the first passage from solid to semi-fluid medium it will often be found that in the colonies on the latter medium there are a few characteristic bacteria threads which as a rule are much more twisted than the streptobacillus normally presents them. On transplanting to a fresh, solid medium one immediately finds a greatly variegated mixture of elements, short twisted threads often divided into coccus-formed elements, isolated cocci greatly varying in form and size and refraction, and larger or smaller clumps of uncharacterizable elements. After 24 hours' growth there are colonies differing greatly in appearance. For example, often there are individual typical streptobacillus colonies, and there are colonies whose elements are reminiscent of the pictures we find in older streptobacillus colonies, but with the difference that the young, newly-formed threads are much twisted and have divided themselves into quite small cocci which lie so close together in bundles that it is impossible exactly to see the position of the individual cocci. It is from these small, dense areas that growth proceeds down into the medium, and it is these areas that are the origin of the β colonies (L_1 colonies). Other small colonies continue to grow on the surface of the medium, constantly throwing out new twisted threads which, however, quickly divide into coccus-formed elements that swell up at a very early stage, often into very large spheres, at first very uniformly refractive but quickly evincing signs of degeneration, becoming granular, vacuolized. Exactly at this stage appear the first fatty, often curiously refractive spheres outside of the cells, presumably originating from a fatty degeneration of the bacterial elements. Very early in the process one can find young colonies composed entirely of large bacterial spheres and extra-cellular drops of fat; and if the elements of such a colony have not succeeded in getting down into the medium, there will be a complete cessation of growth at this

early stage of development. In other colonies there are still shorter or longer, much twisted, genuine bacterial threads which continue to grow so that development proceeds, the result being a new L_1 colony. This simultaneous growth and degeneration is characteristic of the variants of streptobacillus moniliformis. For example, often it is quite easy to follow how one end of a twisted thread quickly becomes degene-

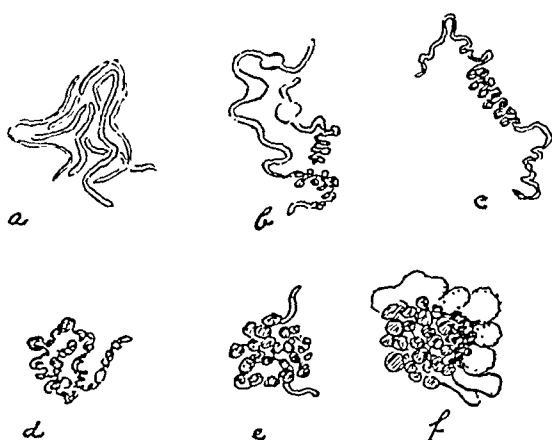


Fig. 1.

48 h's culture at 32° on Bordet Gengou-med. without blood.
Oilimmersion.

atively changed while the other end continues to grow. Frequently it grows down into the medium, in which case the result is colonies of the β type.

Fig. 1 shows some pictures of colonies from the first passage of an α culture. a is a streptobacillus colony. At b we have a twisted thread, very like the pictures we find in older streptobacillus moniliformis colonies, but a one end is the above-mentioned bundle of small cocci; c and d show similar pictures, whereas in e we can see nothing but very short ends of bacterial threads, the remainder being transformed into large spheres, and at f we can see no threads at all, merely large spheres and the commencing formation of froth (*Dienes*) of lace (more feminine, *Klieneberger*).

Fig. 2 is a slightly older picture from another medium.

At a there is a typical streptobacillus moniliformis colony, where the large »holes« are drops of fat. In the other colonies there are irregular bacterial threads, more or less distinct. In most of the small colonies degeneration is far advanced. If at this stage we scrape the surface of the medium clean with the edge of a cover-glass, we shall see that, corresponding to the points where there were conglomerations of small spheres, there is growth down into the medium. Some of the

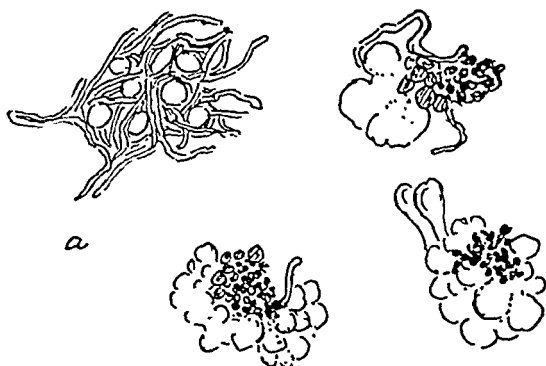


Fig. 2.

48 h's-Bordet Gengou-med. without blood. Oilimmersion.

colonies have the larger or smaller accumulations of fatty messes, often strongly refractive, which in still older colonies may lie like an entire wreath of bulbs about the colonies. They are extremely plastic and under light pressure are liable to assume most varying forms, right to long, often infinitely thin threads. These bodies are called fatty because they are all easily soluble in all the usual fat solvents.

From these observations it will be seen that the α colonies may revert to streptobacillus moniliformis, or that they may give rise to the formation of β colonies (L_1 -colonies). With this particular strain this reversion to streptobacillus moniliformis happened only in the very first passages, but different strains may act differently. One often sees a transplantation from an α culture on solid medium causing a growth of β colonies which will remain unchanged through subsequent passages, though now and then they may revert to α colonies.

β colonies are extremely puzzling, and if one's observations are not compared with one's experience of the α colonies and their conversion to β colonies, it is practically impossible to gain any impression of the course of development, the reason being that there is no thread stage in which the bacterial nature can be established. (The initial thread stages described by *Klieneberger* are artificial products, the occur-



Fig. 3.

L_1 »old« 24 h's culture on 10 % Ascitigen-agar. by a colony under the surface of the medium. b and c show partially surface growth with formation of fatglobules. Oilimmersion N. A. 1.32 — $6 \times B.$ Ortho lux.

rence of which is easily comprehensible when one compares the method employed and the structure of the L_1 colonies.) What makes the investigation still more difficult is the relatively small number of germinative elements present. As a general rule one can obtain growth only from a clump of elements, and as the germinative elements are tiny spheres (see the above description of the α threads) lying in densely entangled bundles, it is not surprising that the examination is a matter of difficulty.

The growth is most perspicuous when it starts with primary penetration of the medium. In these cases it is possible, even 24 hours after growth commences, to find colonies

consisting merely of bundles of spheres, sometimes distinctly arranged in threads (see fig. 3). Down in the medium too the cocci are undergoing a degenerative change similar to that taking place on the surface, except that its progress is slower.

In order to make sure that the colonies which I call β colonies were identical with Klieneberger's L_1 colonies, I asked for a characteristic L_1 strain for comparison; my request was complied with, and for this too I express my thanks. It was marked L_1 -old.

With this strain, which in every respect resembled my own β -variants, I was no more able to obtain a reversion to α -variants or to streptobacillus moniliformis than with certain of my own β -variants. Fig. 3 shows three different types of colony. a was able to grow down into the medium at once and primarily has hardly any surface growth, whereas in c there is already considerable surface degeneration, and downward growth only at the spot built up of densely placed small cocci.

These investigations, like those of *Dienes* and *Dawson & Hobby* (7) show that the L_1 -forms are variants of streptobacillus moniliformis; they also show how this variation takes place. The most peculiar feature of these variants is their strongly degenerative character and their relatively chronic adherence to the deviating morphology. And as we have also seen, these investigations contain no justification for analogizing with the morphology of pleuropneumonia virus, the micromyces forms.

E. Klieneberger was also good enough spontaneously to send me two other microorganisms, marked *Asterococcus canis* I, variety Coarse, and »Ash« L_3 strain. Morphologically they were similar, and both were very like micromyces, except that the mycelia were very short, almost bacillary, and the formation of the elementary of terminal elements occurs very early. The bacillary and small-mycelial character may be visualized in the following manner. A surface culture 24 hours old in a Petri dish is poured over with serum broth so that the

entire surface is wet. After standing for some hours at 32° pieces are cut out of the agar and examined in the usual way, and if required in the manner described for peripneumonia virus. Most of the colonies remain attached to the surface despite the liquid, and in such preparations it is relatively easy to see their structure.

Both *Asterococcus canis* I and »Ash« L_3 strain proved to belong morphologically to the micromyces family, except that the threads they formed were much shorter than those we see on peripneumonia virus. Here again I observed the same tendency to form degenerative fatty spheres, differing slightly in time of occurrence according to the different media. A markedly degenerated old colony of this kind may present a certain likeness to the pictures we observe in colonies of *Streptobacillus moniliformis* variants, but of course one would not venture to employ this similarity for analogizing with regard to botanical relationship. Morphologically, »Ash« L_3 behaves in a rather similar manner. In parentheses I shall merely remark that I found variations in the form of the colonies similar to those described by *Klieneberger* for these microorganisms, variations which indeed are similar to those observed in many strains of micromyces.

Summary.

The best way to study the variants of *Streptobacillus moniliformis* is to watch the way in which they are made. Morphological examination of the relatively constant variant (L_1 -form) does not pay.

On experimenting with a strain *Streptobacillus moniliformis* 4513 it was found that an intermediate form, the α form, arose between *Streptobacillus moniliformis* and the β form (L_1). For a brief period this intermediate form was capable of reverting to *Streptobacillus moniliformis*, but it quickly lost that property.

In quite young cultures the α variant consists of much twisted threads which at an early stage divide into small coccus-shaped elements with a marked tendency to degenerative changes, accompanied by the formation of frequently very large spheres. The α variant has a very great tendency to convert to the β variant, which is identical with *Klieneberger's* L_1 form. In some instances the β variant of the strain would revert to the α variant, in others it remained constant throughout numerous generations. Morphologically the β variant of this strain was identical with an L_1 strain received from *Klieneberger*. Accordingly, there can be no doubt but that the so-called L_1 forms are bacterial variants of streptobacillus moniliformis. None of the variants of the latter presented the slightest morphological resemblance to pleuropneumonia virus or other forms of micromyces.

BIBLIOGRAPHY.

1. *Ørskov, J.*: Annales de l'Inst. Pasteur. 41, 413, 1927.
2. — Zbl. Bakt. I. Orig. 44, 229, 1938.
3. — Acta path. et microbiol. 1942.
4. *Klieneberger, E.*: J. Hyg. 39, 260, 1939.
5. *Dienes, L.*: J. inf. Dis. 65, 24, 1939.
6. *Ørskov, J.*: J. Bact. 7, 537, 1922.
7. *Dawson, M H. & Hobby, G. L.*: Transactions of Assoc. Amer. Physic., Vol. 110, 329, 1939.

ON THE MORPHOLOGY OF PERIPNEUMONIA-VIRUS, AGALACTIA-VIRUS AND SEIFFERTS MICROBES.

By J. Ørskov.

(Received for publication March 22nd, 1942).

It is easy to understand that much work has been done to get the right conception of the morphology of peripneumoniavirus and it is also quite easy to understand that there is not as yet any general accordance in the descriptions of the different developmental phases of this microbe.

What makes one take up this theme again are the relative numerous statements that new found microorganisms are belonging to the same morphological group as the peripneumoniavirus. Some of these statements are according to my view only poorly based. Let me in this connection put in a little remark on the interesting work of *Emmy Klieneberger* (1). I think that her demonstration of the so-called L-forms of microorganismes, whatever the true interpretation of their nature be, belong to the most interesting morphological experiences of the later years. But as to the claim that these are very much like peripneumoniavirus I must maintain that the similarity is quite superficial, and as I mean that it is essential to clear up these problems as far as possible, the first problem is to give the right description of peripneumoniavirus.*)

*) I will here use the opportunity to mention a peculiar mis-

Recently a work of *Dienes* (2) on the morphology of the L-forms has appeared. It gives a new and probably right interpretation of the nature of the L-forms maintaining that they are variant forms of the bacillus moniliformes. But also he analogizes the L-forms morphologically with peripneumonia-virus, however, as far as can be seen not based on personal experiences.

In 1927 (3) I gave a description of the morphology of this microbe and since then rather many works on the same question have been published, among which I specially wish to draw attention to the work of *Ledingham* 1933 (4) who gives a very thorough description of the different morphological features based on a good technique, a description which I am glad to say is in all essential points in accordance with my own description. When I trouble you to-day it is because I think I have come a step further technically in making the examination of this microbe easier, so easy that everybody should be able to convince himself of the morphology without spending any great amount of time and work. It is again the direct agarmicroscopy of unstained cultures which forms the basis for the examinations (5). In my earlier work I used the arch-lamp as light involving all the difficulties this light often gives. In my later work I have used the Leitz-ortholux-microscope which really without giving more than the arch-

understanding of *Klieneberger* in connection with the technique used by me in (7) she writes (8):

»The mycelium-like structures which *Ørskov* has drawn in his paper »On the morphology of Seiffert's micro-organisms« (1938), have not been observed by the writer. One of his techniques of examination cannot be recommended, viz. the spreading of an alcoholic solution of victoria blue on an agar surface covered with growth. As mentioned by the writer in 1936, alcohol has a destructive effect on the growth of pleuropneumonia-like organisms.«

It is not astonishing that alcohol has a destructive effect on the growth of pleuropneumonia-like organisms and of course the application of victoria blue in alcohol would stop the growth but help to give a clear picture of the elements in the colonies at the time of examination.

light facilitates work most markedly. Another little improvement is attained by placing the preparations in the incubator for half an hour before every examination, as this procedure causes an expansion of the elements of the colonies, so that also relatively large colonies can be distinctly surveyed from center to border.

The technique is shortly as follows: A young culture from fluid media is smeared on the surface of a good transparent medium f. inst. a 10 % Ascitique-agar in a petri-dish, thickness of agar about 3 mm. After augmenting incubation-time small agar-blocks are cut out of the agar with a knife and placed on a large slide, a drop of broth is dropped on the agar-surface and on top of this a very tiny truss of cotton threads is placed; finally a large very thin coverslip is added. The cotton-threads causes a constant layer of moisture between agar and coverslip. This agarslide is now placed in the incubator for half an hour, then taken out and examined with the strongest oilimmersion lense available. With this technique it is quite easy to see all the elements in the colonies, and the examination is facilitated much by the fact that the colonies of peripneumoniavirus keep intact very long.

The picture which such a colony presents is very fascinating. From the relatively dense center threads protrude into the broth and the slightest movements in the moisture make the threads flotate passively like the »arms« of a sea-anemone in moving water. Followed successively in this way the development phases are as follows. The elementary bodies, tiny cocci, grow out to branched uniform, homogenous mycelia; after a certain ripening the mycelial branches divide into new elementary bodies without any distinguishable septa being produced, and at a certain age of the colonies the elementary bodies are easily loosened from the branches and can on new medium grow out to new mycelia.

This is the whole normal developmental process of the peripneumoniavirus, and all the other things happening in the colonies are of involutive, degenerative nature. For many other things do often happen in the cultures and most

markedly in surface cultures on solid media, somewhat differently pronounced with different strains and with different media. All these aberrant forms arise generally more and more pronounced the older the cultures get, and in cultures so old that it begins to be difficult to make secondary cultures from them the picture is often so absurd that nothing reminds of the picture just described.

In most of the cultures I have examined degenerative changes take place relatively early and earlier in colonies in solid than in fluid media, and earlier with the elements on the surface of the media than with the elements growing down in the media. These changes start with swellings of the threads and of the coccoid bodies. At the same time the protoplasm gets less homogenous. These swellings can reach very large sizes and at last the colonies nearly only consist of globules some of them larger than red blood cells. When we characterize these aberrant forms as degenerative, it is on account of their irregular forms and their failing growth-ability on new media. The degeneration is partly of a fatty nature, demonstrable by extraction with alcohol or aether. Such a treatment with alcohol often empties the large globules to such a degree that only the membranes are left while normal elements do not change under this treatment. Sometimes the picture gets even more peculiar caused by the formation of extracellular often very large fat globules which are totally solved in alcohol. This fat is probably produced through the degeneration of microbes. All these peculiar forms have given rise to many wonderful speculations and interpretations which according to my experience are superfluous.

The agalactia-virus has a morphology very much like the morphology of peripneumonia-virus, but the branches of the mycelium are shorter and stiffer, and in the strains I have seen the involutive processes were less marked. The Seiffert microbes (5—6) are more like agalactia-virus than peripneumonia-virus, but all of them belong to the same morphologic group.

Finally I would say that it would be of value if in future

we got a so careful description of the morphology of new-found microbes that they are not prematurely included in the peripneumonia group on account of the demonstration that they have threads and globules of different form, size and nature.

BIBLIOGRAPHY.

1. Klieneberger, E.: J. Hyg. 39, 260 (1939).
2. Dienes, L.: J. inf. Dis. 65, 24 (1939).
3. Ørskov, J.: Annal. Inst. Pasteur. 41, 413 (1927).
4. Ledingham, J. C. G.: J. Path. & Bact. 37, 393 (1933).
5. Ørskov, J.: J. Bact. 7, 537 (1922).
6. Seiffert, G.: Zbl. Bakter. I Orig. 139, 337 (1937).
7. Ørskov, J.: Zbl. Bacter. I Orig. 141, 229 (1938).
8. Klieneberger, E.: J. Hyg. 40, 204 (1940).

FROM KAPTEIN W. WILHELMSSEN OG FRUES
BACTERIOLOGICAL INSTITUTE
(CHIEF: PROFESSOR TH. THJØTTA. M.D.), AND THE
OTOLARYNGOLOGICAL DEPARTMENT
(CHIEF: PROFESSOR FRIDTHJOF LEEGAARD. M.D.),
RIKSHOSPITALET, OSLO.

EXPERIMENTAL INFECTION OF A HUMAN WITH FUSOBACTERIUM FROM A BRAIN ABSCESS.

A CONTRIBUTION TO THE UNDERSTANDING OF THE
FUSOSPIROCHETAL INFECTION.

By *Johs. Bøe, M.D.*

(Received for publication March 24th, 1942).

The clinical studies on the fusospirochetal diseases have not given us any definite answer to the question of the pathogenicity of *Fusobacterium*.

There appears to be no doubt that *Fusobacterium* and *Fusospirochetes* play a role in these diseases which often present a very characteristic picture. But no agreement has been reached as to the significance of these microbes, or whether *Fusobacterium* or the spirochetes are the more important.

Thus *H. Vincent* as early as 1899 and many after him have claimed that a fusospirochetal angina takes a more benign course when only fusiform rods are present than when spirochetes are in the majority.

The pathological findings in the fusospirochetal diseases also seem to indicate that spirochetes are more important, and that both microbes play an independant pathological role. Studies of this kind have been reported, among others, by *Rudolf Matzenauer*

(1902), *D. Veszpremi* (1905), *E. Ellermann* (1907), *Ruth Tunnicliff* (1919), *B. S. Kline* (1923) and *David T. Smith* (1932). On the whole these studies give the same result: that both *Fusobacterium* and spirochetes have the capacity to enter previously healthy tissue, from the zone of true necrosis. Spirochetes are usually found farther out in healthy tissue, then there is a zone with *Fusobacterium* and much nearer the surface the other microbes which are often found in their company.

Among clinical findings which indicate that fusospirochetal microbes have pathogenic significance is the fact that these diseases may be contagious (as demonstrated for angina Plaut-Vincenti and Castellani's bronchitis). The fact that a therapy directed against these microbes (especially spirochetes) often seems to have a good effect, for example salvarsan preparations in angina Plaut-Vincenti, also points in the same direction. In this connection it is to be mentioned too that fusobacteria in pure culture have sometimes been found in metastases in pyemia caused by these microbes (*E. C. Rosenow* and *Ruth Tunnicliff* 1912, among others), and in fusospirochetal diseases antibodies against *Fusobacterium* have been found in the patient's serum (demonstrated by *Sverre Dick Henriksen* (1937) and by *Heinrich Dicker* (1938)).

But clinical experiences also seem to show that these diseases relatively seldom take hold in an organism which is healthy and resistant. As a rule the resistance of the organism must be locally or generally lowered. Locally, for example, in places where the possibility for massive new infection is great, or generally where the general condition is poor, for example, because of undernourishment (avitaminosis). These diseases assume their most serious forms in debile patients (noma) or where the organism's resistance is completely destroyed because of hunger. In such cases they may become epidemic (cf. *W. D. Zinserling's* experience in Russia during the famine following the war of 1914—1918).

Nor have the *experimental* investigations on the pathogenicity of *Fusobacterium* given reliable, uniform results.

These experiments are of two different types. In the first place, the attempts which have been made to transfer the fusospirochetal process itself to experimental animals by the injection of suspensions of bacteria directly from the pathological process and by injection of mixed cultures. And secondly experiments with pure cultures. The latter are more reliable and convincing.

Experiments on human subjects are naturally very few in number.

H. Vincent (1896) injected subcutaneously into himself a suspension of the secretions from hospital gangrene. Only a slight swelling

was the result. Similar experiments on three other people also gave negative results.

Xavier Lewcowicz (1903) tried to infect the mucous membrane of the mouth of a small child with a pure culture of fusiform rods but without result.

E. C. Smith (1933) tried injection of pure cultures on volunteers. He was able to demonstrate a marked rise in temperature which he interpreted as an expression of a toxic influence of the bacteria.

In attempts to transfer the fusospirochetal infection to animals, material has been taken from various localizations of this infection. And the results have generally been the same. It is possible to infect experimental animals but it seems that the accompanying microbes have played an important part.

H. Vincent (1899) and *Rudolf Mantzenauer* (1902) injected secretions from noma into experimental animals which resulted in the formation of abscesses. *D. Veszpremi* (1905) who injected pus from fetid abscesses found the same result. *George H. Weaver* and *Ruth Tunncliffe* (1904), who injected mixed cultures into rabbits obtained a strong reaction, both local and general, but they did not find the fusiform rods again in the abscesses, only staphylo- and streptococci. *Kritchewsky* and *Seguin* (1920) used suspensions from Plaut-Vincent's angina and the result was the formation of abscesses at the site of injection in guinea pigs. They were able to transfer the process from animal to animal.

B. S. Kline (1923) who was aware that the predisposing factors were significant in these infections, regularly obtained positive results with injection by injuring the tissue before injection. He obtained a typical picture of fetid gangrene. *David T. Smith* (1932) got the same results without reducing the resistance of the organism beforehand by inoculating sputum from a lung abscess into a guinea pig, but the sputum had to be absolutely fresh, preferably warm. He often saw that the spirochetes in particular increased in number. *Smith* was also able to transfer the process from animal to animal. *Rosebury* and co-workers were also able to do this by using material from Plaut-Vincent's angina and from alveolar pyorrhea (1939).

But the experiments mentioned here represent an unnatural mode of infection. It has been more difficult to transfer the infection by more »natural« methods such as transferring it to mucous membranes where it occurs spontaneously. But this was also possible.

As early as 1889 *W. D. Miller* demonstrated that he could sometimes produce a condition in dogs which resembled alveolar pyorrhea, when he infected them with microbes from patients suffering

from the infection. And *E. M. Marzinorski* (1912) showed that a Plaut-Vincent's angina could be transferred from man to antropoid apes. *David T. Smith* (1932) transferred microbes from a necrotic gingivitis to guinea-pigs with positive results, especially when the resistance of the animals was lowered by poor nourishment (vitamin C deficiency). In some cases he also obtained chronic ulcerations which resembled alveolar pyorrhea.

Evidently then, it often is possible to produce abscesses in experimental animals when they are injected with material from fusospirochetal diseases, and in some cases to transfer the infection to the mucous membrane. But as there are always other microbes present, it is not easy to determine in this manner what role the *Fusobacterium* plays.

Experiments with *pure cultures* of *Fusobacterium* have given very varying results. *Xavier Lewkowicz* (1903) claimed that pure cultures of fusiform rods are virulent. But on the whole the experiments have shown that the pathogenicity of pure cultures is slight, and a number of investigators have found none at all. (*E. Ellerman*, 1904, *George H. Weaver* and *Ruth Tunnicliff*, 1905, *P. Mühlens* and *M. Hartmann*, 1906, *Y. Ozaki*, 1912, and *Tohl Shmamine*, 1912).

John Cohen (1933), who studied the bacteriology of lung abscess very carefully, considered it probable that *symbiosis* between the fusiform rods and the spirochetes was the significant factor, as in combination they had an effect which neither had alone. And *David T. Smith* (1932) tried to demonstrate experimentally that this was the case. He was not able to demonstrate any pathogenicity with his pure cultures of uniform rods, only when he injected them together with other pure cultures in a characteristic manner. He produced typical fetid abscesses when he injected 1) a fusiform rod (his type III.) 2) a spirochete (*Treponema dentium*) 3) a vibrio (*Vibrio viridans*) and 4) an anaerobic streptococcus. He therefore thinks it possible that fusospirochetal angina is due to the cooperation of four such microbes.

Henry H. Lichtenberg and co-workers (1933) found that the pathogenicity of the fusiform rods was uncertain. They repeated Kline's and Smith's experiments and injected their pure cultures both in healthy and injured tissue but they never obtained any fetid abscesses. They regarded the fusiform rods as pure saprophytes which lived and multiplied on necrotic tissue. In support of this view they state that they constantly found abundant fusiform rods and spirochetes in the wounds after aseptic operations in the oral cavity. In the necrotic incrustations after tonsillectomy they found a microscopical picture like that found in Plaut-Vincent's angina.

Ruth Tunnicliff and *Jacob Klein* (1934) were able to produce

fetid abscesses in guinea-pigs when they injected cultures of fusiform rods into animals whose local resistance was reduced by treatment with a glycoside, Scillaren-B. In their »Gross- und schnellwüchsige Fusiforme« W. Bachmann and H. Gregor (1936) were not able to find any definite virulence for mice. Nor were Earle H. Spaulding and Leo F. Rettger (1937) able in spite of extensive experiments to arrive at any definite conclusion as to *Fusobacterium*'s pathogenicity. Three of their strains were lethal to rabbits, but this effect disappeared rapidly. Uncertain or negative experiments of this type in recent times are reported by Heinrich Dicker (1937) and by Charles Weiss and Dora Mercado (1938) among others.

Thus it is seen that there is still disagreement as to *Fusobacterium*'s pathogenic significance. On the one side, there are those who believe these bacteria to be entirely saprophytic; on the other side, there are investigators who take them to be distinctly pathogenic. In consideration of the importance which the predisposing factors seem to have for fusospirochetel diseases, the intermediate view which P. Mühlens (1930 and 1938) holds is the most likely. Mühlens believes that *Fusobacterium* finds good growing conditions in ulcerating processes and that these bacteria, together with the spirochetes, are able to aggravate these processes by penetrating deeply and causing necrosis and gangrene.

Author's Investigations.

During a systematic study of the genus *Fusobacterium* we carried out a series of experiments to investigate the pathogenic significance of these microbes (Johs. Boe 1941). After we had performed most of the animal experiments, we planned to make a number of experiments with injection of pure cultures of our strains into human subjects. In the question of human pathogenicity not even the best animal experiments can equal the value of a single successful experiment on human subjects.

We carried out only one of these planned experiments. After we had made the first experiment on ourself we had, for reasons which will be clear, to abstain from further experiments on others.

For this experiment we used a strain (No. 43) which a short time before had been isolated from a case of brain abscess:

Case history. The patient was a man, 20 year old (L. no. 5719/41, Otolaryngological Department, Rikshospitalet). He had had secretions from the right ear since childhood after an inflammation of the ear. Two weeks before admission to the hospital he had violent pain in the right ear; paracentesis was performed, and ill-smelling pus was evacuated. Five days before admission he became dizzy, had chills, with nausea and vomiting.

On admission (9/1 1941) his general condition was poor. There was no tenderness around the proc. mastoideus, but slight tenderness and swelling around the proc. zygomaticus. There was an oedematous swelling of the auditory meatus with lowering of the roof so that the tympanic membrane was invisible.

It was assumed that there was a chronic otitis, and radical operation and sinus operation were performed immediately after admission (Dr. Opheim).

The operation revealed a chronic otitis with stinking secretion and cholesteatoma masses. The sinus was also affected. It contained organized thrombi without pus.

The temperature was normal the first few days after the operation, but later it became irregular, and the patient had chills. From the first day he was given M. & B. 693, often in large doses, so that in all he was given 126 g.

His condition varied, up and down, in the course of the first month after the operation, but signs gradually appeared which indicated an intracranial focus, either as an epidural abscess or a brain abscess. Revision was therefore performed, and a brain abscess was found in the middle cranial fossa. The abscess was first punctured and about 5 cc. of stinking, reddish brown fluid was evacuated. This was sent in for bacteriological examination (see below). The abscess was opened and drained.

After the operation the patient improved, but his condition varied. Stinking secretion continued to come from the wound. The secretion diminished gradually, but his condition grew constantly worse, and he died on 20/4 1941.

In the pus which was aspirated from the brain abscess, Gram-negative rods and short threads were found. The rods had pointed ends and were slightly granular.

Inoculation from the pus on blood agar plates and ascitic fluid agar plates gave no growth either under aerobic or anaerobic cultivation. Nor was there any growth after inoculation in broth. (There was so much bloody fluid from the abscess that it was almost a blood broth culture). However there was good growth in three tubes with semi-solid brain-heart medium. These were inoculated with large quantities of the bloody fluid.

This strain did not differ in any from our other strains of *Fusobacterium* except that it was difficult to obtain in surface growth.

The strain was kept alive on brain-heart medium to which ascitic fluid was added, and with the 5th generation of the strain the following experiment was performed:

Self-experiment.

On 6/4 1941 at noon 0,4 cc. of a 72-hour culture on brain-heart medium with 5 % ascitic fluid was injected subcutaneously on the left lower arm. Except for a slightly rubor around the place of injection there was no reaction the first few hours.

The next morning at 10 o'clock the temperature was 37,0 C. Around the place of injection there was a large, oedematous, very red swelling. It was about 8 by 5 cm. in extent and was swollen at least 0,5 cm. above the level of the surrounding skin. There was a stinging sensation in the entire arm and the arm was very tender all the way up to the anterior axillary margin, where there was slight swelling of the glands.

The swelling increased as the day wore on. At 10 p. m. the temperature was 37,5 in the axilla. There was a sharply defined rubor around the place of injection, about 10 by 6 cm. in extent. It was clearly limited from the surrounding skin by a roundish ridge. The swelling was now very tender,

especially in the central part where it protruded somewhat, but there was still no sign of abscess formation.

In addition to the well-defined red swelling, the arm was slightly oedematous from the elbow joint to the wrist. There was a stinging pain in the whole arm with tenderness in the axilla, where a bean-sized, sensitive gland could be palpated.

At this time treatment was undoubtedly, indicated, but we preferred to wait until the next morning. By this time the reaction was beginning to recede. The swelling around the injection was just as extensive, but the peripheral ridge was less pronounced, and the peripheral border as a whole was less sharp and paler. The central part, however, had begun to protrude more markedly, but there was still no sign of fluctuation. The oedema also seemed somewhat less, and the arm was not so tender. It seemed the process had become localized. The general condition was not affected.

10/4. The condition was practically unchanged. The tenderness and rubor of the central part had increased, but there was still no pronounced fluctuation. The gland in the axilla had gone down to about the size of a coffee bean.

11/4. There was marked abscess formation with fluctuation in the central part. This was very tender. Rubor decreased evenly outward and the original peripheral infiltration ridge had completely disappeared. The entire lower arm was tender and oedematous.

12/. The pains at night had been so severe that sleep was almost impossible. There was an almost plum-sized protuberance with very red, stretched skin. It was very tender. The consistency was tauntly fluctuating. The arm was oedematous from the elbow joint to just above the wrist.

The abscess was punctured to obtain material for bacteriological examination. About 3 cc. of bloody, brownish, clumped serofibrinous pus was evacuated. It had a strong fetid odor and looked as if it had a couple of gas bubbles in it.

In the pus we found *Fusobacterium* in large numbers and in pure cultures. There were typical pointed rods and filaments mixed together. There was very pronounced phagocytosis.

Inoculation in ascitic fluid stab agar and in brain-heart medium gave abundant growth of *Fusobacterium* in pure culture.

Operative treatment of the abscess was now indicated. Under chlorethyl anaesthesia the abscess was incised (Dr. Gade). It was found to be a well-defined abscess with infiltrated walls. The abscess extended down to the fascia which was infiltrated but not penetrated. The abscess was drained with a tampon. Afterwards 0.30 neosalvarsan was administered intravenously. Tampons were used the first few days. The abscess soon cleared up and healed in a little over a week.

The patient with the brain abscess from which the strain was isolated, had antibodies against the strain in his blood. But the titre was relatively low (positive complement fixation test in serum dilution 1:96). The experimental infection, however, gave good antibody production, demonstrated both by the complement fixation and agglutination. Complement fixation tests with the author's serum and the homologous antigen gave positive reaction in serum dilutions up to 1:800, and five other strains of *Fusobacterium* gave also positive complement fixation with varying titres.

Discussion.

From this experiment, which for a time seemed to be taking a more serious course than was desirable, we can draw some conclusions, as it can be regarded as clear-cut.

In the first place, we can conclude with certainty that *Fusobacterium* *can* be pathogenic to man, and it can be pathogenic by itself *alone*, without the cooperation of other microbes.

It is not possible from this experiment to conclude in what *manner* the microbes exert their influence. The strong reaction which appeared after about 30 hours might point in the direction of a toxic effect, but the further course of the infection showed that it could not possibly be a toxic

effect alone. The glandular swelling and abscess formation where the bacteria multiplied and formed necrosis indicate a true infection.

That the injected culture mass (endotoxins) could have caused the abscess is contradicted by the microscopical findings. After six days abundant bacteria were found in the abscess, they were viable, could be cultivated, and seemed to be in vigorous growth. There was nothing to indicate that the process was receding when the operative treatment was given (except that the process had become localized).

The experiment could thus be interpreted to indicate that the effect of *Fusobacterium* is due both to toxic effect and an invasive capacity.

This experiment also shows very clearly how little one can sometimes conclude from animal experiments as to the behavior of a microbe in man. The strain used here was only slightly virulent for mice, guinea-pigs and rabbits. Thus an intraperitoneal dose of 1,0 cc culture did not kill a mouse while 0,4 cc. of the same culture had the strong effect in a human subject described. We also investigated the pathogenicity for mice of the cultures we made directly from the pus from the abscess, but a dose of 1,0 cc. of these cultures did not kill the mice.

A striking fact in this experiment was that the microbe seemed to have a little capacity to necrotize the skin. In spite of the fact that the abscess was very taut for three days, the skin was intact. There was no sign of rupture although the skin was very tight and shiny. It was our impression that the abscess differed sharply in this respect from an ordinary abscess due to staphylococci.

Summary.

1. With a strain of *Fusobacterium* isolated from a brain abscess a self experiment was performed with subcutaneous injection of 0,4 cc. culture of the 5th generation into the lower arm.

After about 30 hours there was a strong reaction with oedema, rubor and glandular swelling.

In the course of 5 days an abscess developed on the lower arm, with swelling of axillary lymph glands. In the abscess stinking serofibrinous pus was found. Large quantities of *Fusobacterium* in pure culture were found in the pus.

In the author's serum antibodies against *Fusobacterium* were demonstrated both by complement fixation and agglutination tests. Complement fixation tests were positive in serum dilutions up to 1 : 800.

2. The strain injected was non-pathogenic for mice, guinea-pigs and rabbits. The experiment thus illustrates how little animal experiments can be relied upon with regard to the pathogenicity of a microbe for man.
3. The experiment shows with certainty that *Fusobacterium* can be pathogenic to man, and can be pathogenic by itself alone, without the cooperation of other microbes.

LITERATURE

- Backmann, W. und H. Gregor:* Zeitschr. Immunitätsf. 1936 : 87 : 238.
- Boe, Johs.:* *Fusobacterium*. Studies on Its Bacteriology, Serology and Pathogenicity. Oslo 1941.
- Cohen, John:* J. Inf. Dis. 1933 : 52 : 185.
- Dicker, Heinrich:* Zbl. Bakt. I. Orig. 1938 : 141 : 37.
- Ellermann, E.:* Zbl. Bakt. I. Orig. 1904 : 37 : 729.
- Zeitschr. Hyg. 1907 : 56 : 453.
- Henriksen, Sverre Dick:* Studies on the Bacterial Flora of the Respiratory Tract. Oslo 1937.
- Kline, B. S.:* J. Inf. Dis. 1923 : 32 : 481.
- Kritchewsky et Seguin:* cit. *Weinberg, Nativelle et Prevot:* Les microbes anaerobies. Paris 1937.
- Lewcowicz, Xavier:* Zbl. Bakt. I. Orig. 1906 : 41 : 153.
- Lichtenberg, Henry H., Marie Werner and Esther Volkmann Lueck:* J. Am. Med. Ass. 1933 : 100 : 707.
- Marzinowski, E. M.:* Compt. rend. Soc. biol. 1912 : 73 : 389.
- Matzenauer, Rudolf:* Arch. Dermat. u. Syph. 1902 : 60 : 373.

- Miller, W. D.: Die Mikroorganismen der Mundhöhle. Leipzig 1892.
- Mühlens, P.: in: Kollé, Kraus, Uhlenhuth: Handb. d. path. Mikroorg. Jena, Berlin u. Wien 1930. Bd. VII, 2.
- in: Ruge, Mühlens, zur Werth: Krankheiten und Hygiene der warmen Länder. Leipzig 1938.
- und M. Hartmann: Zeitschr. Hyg. 1906:55:81.
- Ozaki, Y.: Zbl. Bakt. I. Orig. 1912:62:76.
- Rosebury, Theodor, Genevieve Foley and Fred. L. Rights: J. Inf. Dis. 1939:65:291.
- Rosenow, E. C. and Ruth Tunnickliff: J. Inf. Dis. 1912:10:1.
- Shmamîne, Tohl: Zbl. Bakt. I. Orig. 1912:65:311.
- Smith, David T.: Oral Spirochetes and Related Organisms in Fusospirochetal Disease. London 1932.
- Smith, E. C.: J. Hyg. 1933:33:95. cit. Spaulding and Rettger 1937.
- Spaulding, Earle H. and Leo F. Rettger: J. Bact. 1937:34:535 and 549.
- Tunnickliff, Ruth: J. Inf. Dis. 1919:25:132.
- and Jacob Klein: J. Inf. Dis. 1934:55:380.
- Veszpremi, D.: Zbl. Bakt. 1905:38:136.
- Vincent, H.: Ann. Inst. Pasteur. 1896:10:488.
- Ann. Inst. Pasteur. 1899:13:609.
- Weaver, George H. and Ruth Tunnickliff: J. Inf. Dis. 1905:2:446.
- Weiss, Charles and Dora Mercado: J. Exper. Med. 1938:67:49.
- Zinserling, W. D.: Veröff. Kriegs- u. Konstitutionspath. Jena 1918 H. 19. Ref. Zbl. Bakt. I. Ref. 1928:91:328.

BEITRAG
ZUR FRAGE VON DER TERATOMGENESE.
DIE MORPHOGENETISCHE THEORIE.

Von *D. E. Holmdahl*.

(Eingegangen bei der Redaktion am 25. März 1942).

Die Genese der Mischgeschwülste ist seit langer Zeit Gegenstand eingehenden Theoretisierens. Die Sonderstellung dieser Geschwülste mit ihren verschiedenartigen Gewebeelementen hat natürlich viele Erklärungen hervorgelockt. In der grossen Menge der aufgestellten Hypothesen können wir vor allem zwischen bigerminaler und monogerminaler Entstehung unterscheiden. Bei der bigerminalen Genese gehen Individuum und Teratom von zwei verschiedenen Anlagen aus. Geschwülste dieser Art sollen an der Oberfläche liegen und können als Zwillingsbildungen angesehen werden, die frühzeitig in abnorme formale Bahnen eingelenkt worden sind. Die im Körper befindlichen Teratome dürfen in der Regel als monogerminal betrachtet werden. Dies bedeutet die Voraussetzung, dass sie sich aus einer gemeinsamen Anlage entwickeln. Der bekannte Ausdruck *foetus in foetu* dürfte deshalb in den meisten Fällen als irreführend gelten.

Von diesem monogerminalen Ausgangspunkt her ist im Laufe der Jahre eine grosse Anzahl Theorien aufgestellt worden, von welchen folgende die wichtigsten sein dürfen:

- 1) Die Polzellentheorie.
- 2) Die Blastomerentheorie.
- 3) Die Parthenogenesistheorie.
- 4) Die morphogenetische Theorie.
- 5) Die Organisatortheorie.

Von diesen fünf Theorien sind die drei erstgenannten wohl-bekannt und brauchen kaum näher erörtert zu werden. Deren übliche Benennung sagt übrigens unmittelbar, um was es sich hier handelt. Die vierte Theorie, hier die morphogenetische benannt, ist von mir bereits 1925 im Anschluss an meine erste Arbeit über die zweifache Morphogenese des Vertebratorganismus skizziert worden. Sie ist von mir später, 1936, eingehender entwickelt worden. Die Bezeichnung »morphogenetische Theorie« ist hier zum ersten Male angewandt worden. Wie im folgenden gezeigt werden soll, ist diese Benennung dadurch motiviert, dass sie sich auf das formhistorische und materialhistorische Geschehen bei der Anlegung des Vertebratorganismus stützt. Ausgangspunkte sind also die formalen Eigenschaften, die Materialbildung samt Materialverschiebung, was alles unter den Begriff Morphogenese zusammengefasst werden kann.

Die Organisatortheorie, die in der teratologischen Literatur schon von *Budde* (1926), später von *Karvonen* (1934) und *Kaphka* (1936) entwickelt sein soll, ist kürzlich eingehend von *I. Hedenberg* (1942) behandelt worden, im Anschluss an eine kasuistische Mitteilung eines Falles mit retroperitonealem Teratom, das mit glücklichem Ausgang operiert wurde. Diese Theorie gründet sich auf *H. Spemanns* Einschnürungs- und Transplantationsversuche, die zu den entwicklungsmechanischen Begriffen Induktion und Organisation geführt haben. Es sind diese beiden Prozesse, welche, auf die menschliche Pathologie bezogen, Anlass zur Organisatortheorie gegeben haben, und gemäss *I. Hedenberg* macht diese Theorie Anspruch darauf, dass sie bis jetzt die beste Erklärung für die Teratombildungen überhaupt liefert.

Da diese Organisatortheorie keine Rücksicht auf die mor-

phogenetische Theorie genommen hat, auch nicht auf formale Realitäten irgendwelcher Art, — abgesehen von einer oberflächlichen Schilderung der dorsalen Urmundlippe bei den Amphibien —, halte ich es für wohl begründet, auf den Inhalt dieser beiden Theorien näher einzugehen. Wie wir sehen werden, haben die beiden Theorien vieles gemeinsam, auch wenn die Ausgangspunkte sehr verschiedene sind. Beide betrachten nämlich abgesprengte Teile als genetischen Faktor.

Bei der Behandlung der Organisatortheorie halte ich mich an die Deutung, die *I. Hedenberg* derselben gegeben hat. Diese repräsentiert nämlich die letzte und ausführlichste Darstellung auf diesem Gebiete.

Es scheint mir richtig, mit einer kurzgefassten Schilderung von *I. Hedenbergs* Vorlegung der Frage und seiner Auffassung von der Organisatortheorie zu beginnen. In seiner theoretischen Auseinandersetzung sagt dieser Verfasser, dass die bigerminale Theorie kaum die Entstehung der im Körper liegenden Teratome erklären kann und lehnt deshalb gleich vielen anderen den Ausdruck *foetus in foetu* für diese Geschwulstformen ab. Er findet daher die monogerminalen Entwicklung am wahrscheinlichsten und behandelt demnach die wichtigsten Theorien, die unter diesen Ausgangspunkt eingeordnet werden können. Die Polzellentheorie samt Blastomeren theorie werden als unwahrscheinlich abgelehnt, während die Parthenogenesistheorie, gestützt auf *W. Bosaeus'* grosse Arbeit (1926) über Ovarialembryome, diskutiert wird.

Um eine einheitliche Auffassung von der Teratomgenese zu erhalten, vertritt Verf. die Meinung, dass die parthenogenethischen Implantate in *Bosaeus'* Versuch wahrscheinlich durch Induktion erklärt werden können. Die Implantate selber sollen also keinen Anlass zu Geschwulst-ähnlichen Bildungen, wie *Bosaeus* sie in seinen Versuchen erhielt, geben können. Wenn man notwendigerweise zu einer einheitlichen Genese für alle Teratome im Körper gelangen will, kann man natürlich auf solch eine Möglichkeit hinweisen, aber irgendeine Andeutung von Beweis, dass es sich so verhält, hat Verf. nicht geliefert. *Bosaeus'* eigener Gedanke ist der, dass die

Teratome verschiedene Genesen haben, was a priori ebenso glaublich scheint.

Nach Ablehnung dieser drei Theorien kommt Verf. auf die Organisatortheorie zu sprechen, die eine einheitliche Erklärung für die Genese der Teratome liefern soll. Verf. gibt zuerst, ausgehend von *Spemanns* klassischen Versuchen, Beispiele für die Begriffe Induktion und Organisation. Ferner deutet Verf. darauf hin, dass das organisierende Vermögen im Urdarmsdach und im Gewebe um den Urmund zu finden sei. Bei den Amnioten mit Primitivstreifen, welcher ohne Zweifel sowohl homolog als auch analog mit dem Urmund ist, soll dieselbe organisierende Fähigkeit innerhalb und um den Primitivstreifen zu finden sein. Die Entstehung der Teratome soll derart geschehen, »dass Material mit Induktionsvermögen aus der normalen Lage losgesprengt wird und die Umgebung beeinflusst«. Die Variationen in der Ausformung der Teratome werden damit erklärt, dass die Absprengung bei den höher differenzierten Teratomen, z. B. den Tridermonen, vom Primitivstreifen selbst geschieht, welcher als Träger der organisierenden Eigenschaften betrachtet wird, während ein weniger differenziertes Teratom von einem Primitivstreifenderivat, z. B. dem Mesoderm, ausgehen soll. Diese Hypothese scheint dem Verfasser »ziemlich haltbar« und ist, seiner Meinung nach, diejenige Theorie, die »gegenwärtig die beste Erklärung liefert«.

Gegenüber diesem Gedankengange kann man die allgemeine Anmerkung richten, dass es überhaupt sehr unsicher ist, mit Ausgangspunkt von den beiden entwicklungsmechanischen Prozessen, Induktion und Organisation, zu einer generellen Erklärung der Tumoren zu gelangen, die im grossen und ganzen irgendwo im menschlichen Organismus auftreten können. Erstens sind Induktion und Organisation hauptsächlich an Amphibienmaterial studiert worden und in so frühem Entwicklungsstadium, in dem nur ein ganz unbedeutender Teil des Körpers gebildet ist, und zweitens geht es nicht, diese Erfahrungen ohne weiteres auf die höheren Tiere und den Menschen zu übertragen.

Unter allen Umständen muss man, bevor man hierzu berechtigt ist, sich mit der *normalen* Morphogenese des Vertebratorganismus vertraut machen, die im vorderen und hinteren Teil des Körpers ganz verschiedenartig ist.

Wenn der Verfasser z. B. davon spricht, dass die Organisatorwirkung im späten Neurulastadium nicht nötig ist, lässt er ganz und gar ausser Acht, dass der grösste Teil des Embryonalkörpers noch nicht angelegt ist (D. E. Holmdahl, 1925 u. später, K. Peter, 1926, 1934, 1941, B. F. Kingsbury, 1932 u. a.). Die Organisatortheorie dürfte also gemäss Verf. nur auf den kranialen Teil des Tierorganismus bezogen werden und doch soll die Theorie für den ganzen Körper angewandt werden, nicht zu mindest für den kaudalen Teil.

Dadurch, dass der Verfasser die normale Morphogenese nicht beachtet hat, ist ein grosses und viel diskutiertes Forschungsgebiet übersehen worden, welches uns erlaubt, der Frage nach der Teratomgenese viel näher zu kommen als mit einer oberflächlichen Verwertung zweier entwicklungsmechanischer Prozesse.

Es dürfte klar sein, dass, wenn man vom Primitivstreifen resp. der dorsalen Urmundkante als dem Träger von organisierenden Eigenschaften spricht, Rücksicht auf die formale Gestaltung des Gewebes, welches diese organischen Bildungen aufbaut, genommen werden muss. Aus dem formalen Charakter dieses Gewebes kann man nämlich bestimmte Schlüsse auf die prospektive Potenz und prospektive Bedeutung ziehen, Verhältnisse, die von grösstem Gewicht für die Beurteilung der eventuellen Einwirkung der »abgesprengten« Zellkonglomerate auf die Entstehung von Tumoren sind. Hierüber sagt M. Borst (1936) bezüglich dieser Mischgeschwülste folgendes: »Viel häufiger haben die verschiedenen Gewebe enge genetische Beziehungen zueinander; sie stellen verschiedenartige Differenzierungsprodukte eines gemeinsamen indifferenten Keimgewebes dar«. Es ist der formale Differenzierungsgrad der Zellen, welcher ausschlaggebend ist. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit (1939) mit dem Titel: »Die Morphogenese des Vertebratorganismus vom formalen und experi-

mentellen Gesichtspunkt« erläutere ich es folgendermassen: »Wenn wir dies auf die formale Verschiedenheit im Differenzierungszustand der indifferenten Zellmasse und der Keimblätter beziehen, muss hieraus folgern, dass diese formale Verschiedenheit auch einen entwicklungsmechanischen Unterschied hinsichtlich Potenz und Determination bedingt«.

Man ist also, meiner Meinung nach, zu einer Behandlung der Frage nach der Teratogenese nicht berechtigt, ohne gleichzeitig unsere Kenntnisse von der normalen Morphogenese des Vertebratorganismus berücksichtigt zu haben. Hier gibt es einen grossen Wissensbereich, der seit Beginn der modernen Morphologie lebhaft erörtert und umstritten worden ist. Vor allem *O. Hertwig* und *Fr. Keibel* haben sich Ende des vorigen Jahrhunderts eifrig hiermit beschäftigt, und während des letzten 1½ Jahrzehntes hat diese Frage erneute Aktualität u. a. durch die Lehre von der primären und sekundären Körperentwicklung erhalten.

Im Jahre 1925 gründete ich diese Theorie, die später von verschiedenen Seiten viel diskutiert worden ist. In diesem Zusammenhange halte ich es für überflüssig, sie aufs neue eingehender zu behandeln, sondern möchte auf eine Übersichtsdarstellung hinweisen, teils in *Nordisk Medicin* (Bd. 11, 1936) »Groddbladsläran från medicinsk synpunkt«, teils in *Upsala läkareförenings förhandlingar* (N. F. Bd. 42, 1936) »Neue Gesichtspunkte zur frühen Embryonalentwicklung«. Hier ist auch die wesentlichste Literatur des betreffenden Gebietes bis zu dieser Zeit zu finden.

Seitdem ist dieses Problem weiterhin erörtert worden. Ich will hier besonders *J. Pasteels'* Arbeiten nennen (z. B. 1936 u. 1937), meine darauf folgenden Untersuchungen (1939) samt *K. Peters* letzte grosse zusammenfassende Studie desselben Themas (1941).

Auf dem Anatomkongress in Budapest (1939) war die primäre und sekundäre Körperentwicklung Diskussionsgegenstand, und die einzige Meinungsverschiedenheit, die zwischen *W. Vogt* und mir übrig blieb, war die Frage nach der Entwicklung des Entodermes bei den Amphibien. *W. Vogt* teilte

nicht meine Ansicht, dass das Entoderm dieser Tiere durch sekundäre Körperentwicklung entstehe, ging jedoch darauf ein, dass die Morphogenese sich im übrigen auf die von mir geschilderte Weise vollziehe. Später hat *K. Peter* (1941) die-

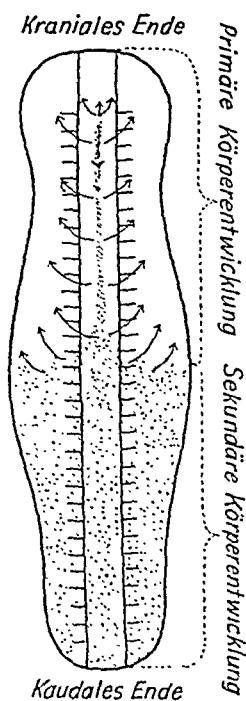


Fig. 1.

Schema über die Körperentwicklung bei den Wirbeltieren. Die Erklärung dieser Figur ist im Text zu finden.

ses Problem in seiner oben erwähnten ausführlichen Auseinandersetzung besonders behandelt und ist dabei zu folgendem Schlusssatz gelangt: »Bis mich neue Forschungen eines Besseren belehren, glaube ich, gestützt auf die Ergebnisse *Hoadleys* und die bei anderen Tieren gewonnenen Erkenntnisse, dass sich auch bei den *Amphibien* eine sekundäre Körperentwicklung und damit ein in loco in der Schwanzknospe entstehendes Entoderm findet«. Das Resultat von *K. Peters* grosser Analyse lautet: »Wir können also für die Wirbel-

tiere eine indirekte (primäre) und eine direkte (sekundäre) Entwicklung annehmen».

Die Frage nach der primären und sekundären Körperentwicklung ist also tiefgehend bearbeitet worden und mit dem Ergebnis, dass man nunmehr die Existenz einer formalen zweifachen Morphogenese des Vertebratorganismus anerkennt. Da deren Inhalt von grundlegender Bedeutung u. a. für die behandelte Teratomgenese ist, muss ich die beiden Entwicklungsformen etwas berühren. Ich werde hier hauptsächlich von den Verhältnissen bei den Amnioten ausgehen, was in unserem Zusammenhange von grösstem Interesse ist, da sie auf die Entwicklung beim Menschen bezogen werden.

Um in Kürze eine Vorstellung davon zu geben, um was es sich hierbei handelt, verweise ich auf beistehende schematische Abbildung (Fig. 1) aus meiner ersten Arbeit (1925) über die zweifache Morphogenese. Die Figur stellt einen fertiggebildeten Embryonalkörper dar, mit allen Segmenten angelegt. Das Kranialende ist nach oben gerichtet, das Kaudalende nach unten. Das zentrale, mit parallelen Strichen abgegrenzte Gebiet ist das zentrale Nervensystem, das sich durch den ganzen Körper erstreckt. In diesem Falle soll es nicht als ein Rohr gedacht sein, sondern als eine Neuralrinne mit den Neuralwülsten lateralgerichtet. Lateral vom zentralen Nervensystem sind die Körpersegmente markiert, welche weiterhin lateral in die Ursegmentstiele und Seitenplatten übergehen. Ganz kranial fehlt diese Segmentierung. Der ganze Embryonalkörper, mit allen Segmenten ausgebildet, ist also nach den Seiten zu ausgebreitet gedacht, was bei den Amnioten die ursprüngliche Lage darstellt, bevor die Ventralbiegung um das zentrale Nervensystem zustande gekommen ist.

Legt man einen Schnitt durch eines der Segmentpaare, so erhält man das Bild eines »Urkörperquerschnittes«, dessen verschiedene Teile aus der schematischen Abbildung in Fig. 2 hervorgehen. Hier sieht man zu oberst das Ektoderm mit den Neuralplatten und der Neuralrinne in der Mitte,

darunter das Derivat des Mesodermes, die Ursegmente, Ursegmentstiele und längst lateral das Somato- und Splanchnopleura der Seitenplatten, welche das Zölom abgrenzen. Zu unterst im Bilde befindet sich das plane Entoderm. Unter

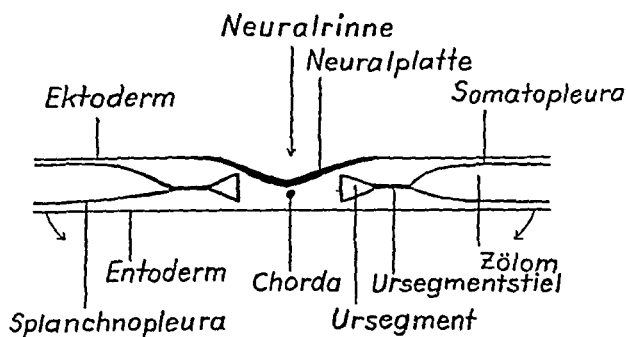


Fig. 2.

Schema über den Urkörperquerschnitt vor der Ventralbeugung.

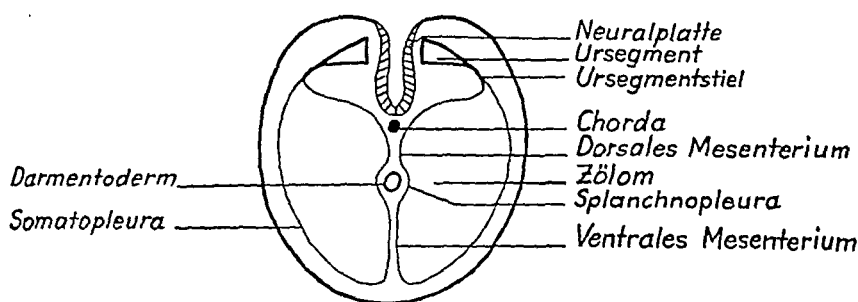


Fig. 3.

Schema über den Urkörperquerschnitt nach der Ventralbeugung.

der Mitte der Neuralrinne, zwischen dem Ekto- und Entoderm, liegt die Chorda.

Die Ausgestaltung des Embryonalkörpers geschieht durch Ventralbeugung der Seitenteile. Diese Formveränderung wird durch die Pfeilrichtung in Fig. 2 angegeben. Nachdem sich die Ventralbiegung und Verschmelzung in der ventralen Mittellinie vollzogen hat, bildet das Entoderm mit der Splanchnopleura den rohrförmigen Darm mit seinen Mesenterien, während das Ektoderm mit der Somatopleura die ventro-laterale äussere Körperwand ausgestaltet. Dies wird in der schematischen Abbildung von Fig. 3 veranschaulicht.

Fig. 1 demonstriert die Rolle, welche der Primitivstreifen bei der Entstehung des Embryonalkörpers spielt. In der vorderen Hälfte des Körpers, vom Bereich des Hinterkopfes nach hinten zu, wird *direkt* von dem formal indifferenten Blastem des Primitivstreifens eine kleine Mittpartie des Körpers gebildet, nämlich eine Mittpartie der Neuralrinne, ferner die Chorda und das unterliegende Entoderm (vgl. Fig. 2 u. 3). Dieser axiale indifferente Blastemstrang hat nicht nur eine solche begrenzte Aufgabe bei der Ausformung des Vertebratorganismus. Ähnlich dem, was ich auf formanalytischem Grunde bereits 1925 angenommen habe, und in Übereinstimmung mit mehreren späteren experimentalanalytischen Versuchen, kann sicher behauptet werden, dass der Primitivstreifen daneben ein bedeutungsvolles Materialbildungszentrum ist (R. Wetzel u. a.). Von hier aus entwickeln sich die Keimblätter im vorderen Teil des Körpers, was durch die in Fig. 1 eingelegten Pfeile veranschaulicht wird. Bei dieser Bildung der Keimblätter wird indifferentes Blastem verbraucht, wobei dieses gleichzeitig zu den Zellenverbänden ausgestaltet wird, welche die verschiedenen Keimblätter charakterisieren. Das verbrauchte Blastemmaterial wird durch Neubildung im Blastemstrang ersetzt.

Während dieses material- und formgeschichtlichen Geschehens verschiebt sich sozusagen das indifferente Blastem immer weiter in kaudaler Richtung (Fig. 1). Der vordere Teil des indifferenten Blastemstranges schwillt hierbei mehr und mehr an und bildet den Endwulst, wodurch der hintere Teil des Primitivstreifens andauernd verdünnt wird. Diese hintere Partie, welche die Kloakenmembrananlage bildet, wird bald ventralgebogen, so dass der Endwulst den Embryonalkörper kaudal knospenförmig abgrenzt. So bildet der Endwulst die Rumpfschwanzknospe, welche, wie der Primitivstreifen, ein formal indifferentes Blastem enthält.

Durch die neue formale Lage, die mit der Ventralbiegung des kaudalen Teiles des Primitivstreifens sowie durch die Zusammendrängung und Vergrößerung des vorderen Teiles des Primitivstreifens aufgekommen ist, entwickeln sich von nun

ab die Neuralanlage, die Chorda, das Mesoderm und der Darm (Schwanzdarm) direkt aus dem Bildungsblastem. Diese Neubildung der Organe geschieht also direkt aus indifferentem Blastem. Im hinteren Teil des Körpers entstehen deshalb die Organe nicht länger aus zuvor ausdifferenzierten Keimblättern.

Die Entwicklungsform im vorderen Teil des Vertebrat-organismus, der also im wesentlichen aus den Keimblättern entsteht (Fig. 1), wird die primäre (gemäss *K. Peter* die indirekte) Körperentwicklung genannt, während die Entwicklungsform im hinteren Teil, der also direkt vom indifferenten Blastem gebildet wird, ohne Keimblätter als Zwischenstadium, als sekundäre (gemäss *K. Peter* die direkte) Körperentwicklung bezeichnet wird. Die Grenze zwischen diesen formal verschiedenen Entwicklungsformen liegt deutlich bei den verschiedenen Tierarten in variierender Höhe und beim Menschen dürfte sie ungefähr in der Mitte des Rumpfes zu finden sein.

Es scheint mir selbstverständlich, dass diese neue Betrachtungsweise bezüglich der normalen Morphogenese des Vertebratorganismus berücksichtigt werden muss, wenn es gilt, die Genese der Teratome zu beurteilen. Ich habe hierauf bereits 1925 hingedeutet und in meinem oben erwähnten Übersichtsartikel in Upsala läkareföreningens förhandlingar (1936), äussere ich dies folgendermassen: »Die neuen Auffassungen müssen auch den morphogenetischen Teil der Schwulstlehre beeinflussen. Wir haben gesehen, dass die ganze hintere Hälfte des Körpers sich aus einem gemeinsamen indifferenten Materialbildungszentrum entwickelt. Dies gilt auch — was ich hier nicht berühren konnte — von einer schmalen Mittelpartie des Körpers von der Gegend des Hinterkopfes nach hinten zu, also dem Teil des Vorderkörpers, welcher direkt vom Primitivstreifen selbst ausdifferenziert wird, und der bei den entwickelten Individuen einer dorsalen schmalen Mittelpartie des Halses und des Mediastinums nach vorn zu bis zur dorsalen Wand des Digestionsrohres entspricht. Hier besteht die Möglichkeit, dass abgesprengte Stücke Veranlas-

sung zu Geschwülsten von Teratom- und Dermoidzystennatur geben können. Der übrige Körperteil ist Keimblatt-determiniert, wobei die prospektiven Möglichkeiten mit der Keimblätterbildung verdrängt werden«.

Wenn ich in diesem Zusammenhange von abgesprengten Teilen aus dem formal indifferenten Blastem des Primitivstreifens bzw. der Rumpfschwanzknospe spreche, kann dies geschehen, ohne dass man dabei an das Organisatorprinzip zu denken braucht. Dies bringt einen grossen Vorteil und bewirkt mehr Klarheit, da dieses Prinzip für den hinteren Teil des Vertebratororganismus nicht geprüft und bestätigt worden ist und daher nicht ohne weiteres hierauf bezogen werden kann. Die gedachten losgetrennten Stücke sind formal indifferent mit bekannter prospektiver Bedeutung wie auch Potenz. Normalerweise entstehen aus diesem Blastem alle drei Keimblätter in derjenigen Partie des Vertebratororganismus, wo diese gebildet werden, und im hinteren Teil des Vertebratorkörpers veranlasst dasselbe Blastem direkt die Entstehung aller der Organe, welche zuvor, abgesehen von einer kleinen Mittpartie, von den drei Keimblättern angelegt wurden, wie Neuralrohr, Chorda, Mesenchym und Darm. Daher ist man zu der Annahme berechtigt, dass solche abgesprengten Zellkonglomerate Anlass zu Geschwülsten gerade von Teratomnatur geben können. Hier braucht man nicht, wie oben erwähnt, von einer Organisatorwirkung zu sprechen. Die Zellen selber haben diese innewohnende weite Potenz.

Man kann auch annehmen, dass die Teile des Vertebratororganismus, die direkt vom indifferenten Blastem gebildet werden, grössere Voraussetzungen besitzen, solche Absprengungen einzuschliessen als die Gebiete, welche aus Keimblättern entstehen, bei denen die Organbildung also von zuvor ausdifferenzierten Keimblättern mit bereits verdrängter Potenz und Determination geschieht.

Dieser Gesichtspunkt, der natürlich vorläufig noch hypothetisch ist, gibt uns indessen die Möglichkeit, die gewöhnlichsten Lokalisationen der Teratome zu erklären, und hierdurch wird die von mir dargestellte Theorie indirekt gestützt.

Gemäss der skizzierten Ausgangslage dürften wir erwarten, dass die Teratome mit Vorliebe in der Mittellinie des Körpers auftreten, von der Bodenpartie des Neuralrohres bis zur Dachpartie des Verdauungskanales (vgl. Fig. 1—3). Dies würde für den primären Körperentwicklungsbereich von der Keilbeinkörperregion bis zur oberen Bauchregion gelten. Wir finden auch, dass die Teratome mit Vorliebe am Mediastinum und der oberen Bauchregion retroperitoneal lokalisiert sind. *E. Karvons* und *I. Hedenbergs* Fälle demonstrieren alle beide ebenfalls ein solches Bauchteratom.

Für das Gebiet der sekundären Körperentwicklung dagegen sollten zufolge der angeführten Ausgangspunkte grössere Möglichkeiten vorhanden sein, dass abgesprengte Zellen in verschiedenen Teilen des Körpers auftreten können, auch wenn man voraussetzen muss, dass die primäre Lokalisation während der ersten Periode der sekundären Körperentwicklung wesentlich an der Mittellinie geschieht. Dies stimmt auch mit dem bekannten Vorfinden der Teratome überein. Erstens kann man hier auf Spina-Bifida-Missbildungen hindeuten, die nicht selten mit Tumorbildungen von Teratomtypus kombiniert sind. Diese Missbildungen sind, wie wir wissen, vor allem in der Lumbosakralregion zu finden, eine Tatsache, die übrigens ihre erste befriedigende Erklärung durch die zweifache Morphogenese (*D. E. Holmdahl*, 1925 u. später, *O. Ask*, 1941) erhält. Zweitens gewinnt man auch Klarheit über die nicht seltenen Sakralparasiten und übrigen Teratome samt Dermoidzysten in der Sakralregion. Besonders die Steisssteratome, welche oft von grossen Teilen des Hinterkörpers und nicht selten vom ganzen Hinterkörper ausgehen, finden auf Grund der sekundären Körperentwicklung eine natürliche genetische Erklärung. Das indifferente Blastem ist hier in seiner Gesamtheit in abweichende formale Bahnen gelenkt worden.

Dasselbe kann auch von der anderen polaren Teratombildung, dem Epignathus, gesagt werden, der ebenso vom vordersten Teil des Primitivstreifens, unmittelbar nach dessen Auftreten hergeleitet werden kann. Diese Teratome gehen

oft gerade vom Rachendach aus, das die vorderste Grenzlage für den Primitivstreifen darstellt.

Diese ganze Betrachtungsweise schliesst natürlich nicht aus, dass abgesprengte Zellkomplexe bei der Keimblätterentwicklung aus dem indifferenten Blastem mitfolgen, wodurch Teratombildungen auch in den Körperregionen entstehen können, in welchen die Organe aus den Keimblättern hervorgehen. Die Voraussetzungen hierfür scheinen jedoch geringer zu sein, da man annehmen muss, dass der Keimblätterverband durch die bald eintretende Determination, die immer mehr verdrängt wird, auf dem Wege der Induktion sehr zeitig solche Lostrennungen beeinflusst und deren Wirkungen beseitigt.

Durch diesen morphogenetischen Gesichtswinkel erhält man eine allgemeingültige Auffassung von der Genese der Teratome, die für den ganzen Vertebratorganismus gelten kann. Unter allen Umständen befinden wir uns mit dieser Betrachtungsweise auf sehr sicherem und greifbarem Grund, zum Unterschied von dem unzuverlässigen Anhalt, den eine oberflächliche Verwertung des Organisatorprinzips bedeutet, dessen Geltungsgebiet unsicher ist. Man braucht für das Verständnis auch nicht unbekannte chemische Substanzen zu supponieren. Der formale Bau der Zellenverbände, welcher uns erlaubt, bestimmte Schlüsse aus der innewohnenden Potenz sowie Determination ziehen zu können, und ein bekanntes materialgeschichtliches Geschehen, das auf formalem und experimentellem Wege festgestellt werden kann, bilden einen offenbaren und sicheren Ausgangspunkt. Unter allen Umständen müssen diese Forschungsgebiete mitberücksichtigt werden, wenn man auf ein Theoretisieren über die äusserst spitzfindige Frage nach der Genese der Teratome eingeht.

Einen grossen Vorteil scheint die von mir seit 1925 verfochtene und hier näher erläuterte, auf die Morphogenese des Vertebratorganismus gebaute Theorie von der Teratogenese gegenüber der von *I. Hedenberg* behandelten Organisatortheorie zu besitzen. Sie macht keinen Anspruch darauf, die Blastomeren- oder Parthenogenesistheorie abzuwei-

sen, welche beide sehr wohl in meine Betrachtungsweise eingeräumt werden können.

Ich will hier nur in Kürze darauf hindeuten, dass bei den wirbellosen Tieren (Würmern und Copepoden) gezeigt worden ist, dass die Zellen sich zeitig im Blastomerenstadium in Urgeschlechtszellen und somatische Zellen aufteilen. Erstere behalten ihren Chromosombestand von Vater und Mutter unverändert bei, können von den somatischen Zellen, welche das Individuum aufbauen, unterschieden werden und sammeln sich später in Geschlechtsdrüsen. Inwiefern diese interessante Feststellung auf die Wirbeltiere bezogen werden kann, ist sehr in Frage gestellt worden. Dies beruht darauf, dass man bei diesen höheren Tieren nicht mit Sicherheit die Bahn der Urgeschlechtszellen während der Ontogenese verfolgen kann.

Gemäss meiner Betrachtungsweise kann man gegenwärtig die Möglichkeit nicht ausschliessen, dass dieselbe Aufteilung in germinative und somatische Zellen in frühem Blastomerenstadium auch bei Wirbeltieren und dem Menschen stattfindet. Es kann sehr wohl vorausgesetzt werden, dass das indifferente Blastem sowohl somatische als auch germinative Zellen enthält, auch wenn diese formal nicht zu unterscheiden sind. Beim Aufbau des Körpers, wobei die somatischen Zellen indirekt oder direkt Keimblätter und Organe bilden, welche allmählich eine harmonische Einheit schaffen, wandern die germinativen Zellen ihren Weg zur Geschlechtsleiste und den Geschlechtsdrüsen. Hierunter kann ein Teil zurück bleiben, ohne das Ziel erreicht zu haben, weshalb man annehmen kann, dass die germinativen Zellen auf parthenogenetischem Wege Teratome veranlassen können, nicht nur in den Geschlechtsdrüsen selbst, sondern auch ausserhalb derselben.

Wenn solche ausserhalb der Geschlechtsdrüsen liegenden parthenogenetischen Teratome existieren, so müssten sie in der hinteren Körperwand an der dorsalen Mesenterialwurzel und um dieselbe wiederzufinden sein. Auf Grund der grossen Ausdehnung der Geschlechtsleiste gilt dies von einem weit gestreckten Gebiet im Rumpfe. Es ist also denkbar, dass

die mediastinalen und retroperitonealen Teratome auch auf parthenogenetischer Basis entstehen können. Der Prädilektionsplatz für diese Teratome dürfte jedoch in den Geschlechtsdrüsen liegen.

Die von mir skizzierte Teratomgenese schliesst also sowohl die Blastomeren-theorie als auch die Parthenogenesistheorie in sich ein. Dasselbe kann natürlich auch von der Polzellentheorie gesagt werden. Ich nehme davon Abstand, auf diese Theorie näher einzugehen. Die von vor allem *W. Bosaeus* lancierte parthenogenetische Auffassung der Geschlechtsdrüsenderatome erhält indessen durch meine Betrachtungsweise eine erweiterte Verwertung.

Die Organisatortheorie scheint mir dagegen unklar und kann nicht ohne weiteres auf den ganzen Vertebratorganismus bezogen werden. Ihr Mangel liegt darin, dass sie nicht nötige Rücksicht auf formale Realitäten nimmt. Dies ist eine Schwäche, welche durchweg die heutige entwicklungsmechanische Forschung kennzeichnet; eine Tatsache, die früher von mir und *R. Wetzel* mit Schärfe hervorgehoben worden ist.

LITERATURVERZEICHNIS.

- Ask, O.*: Studien über die embryologische Entwicklung des menschlichen Rückgrats und seines Inhaltes unter normalen Verhältnissen und bei gewissen Formen von Spina Bifida. Akad. Abhdl., Upsala Läkareförs förh., N. F., Bd. 46, 1941.
- Borst, M.*: Echte Geschwülste (Gewächse, Blastome). Pathol. Anat. von *L. Aschoff*, Jena 1936.
- Bosaeus, W.*: Beiträge zur Kenntnis der Genese der Ovarialembrione. Akad. Abhdl., Uppsala 1926.
- Budde*: Nach *I. Hedenberg*.
- Hedenberg, I.*: Om blandsvulsternas genes i anslutning till ett opererat fall av intraabdominellt teratom. Nordisk Medicin, Bd. 13, 1942.
- Hoadley, L.*: Mesoblast differentiation in implants of portions of the tailbud (amblystoma punctatum). Extr. des archives de biol., Bd. 42, 1931.

- Holmdahl, D. E.*: Die erste Entwicklung des Körpers bei den Vögeln und Säugetieren, inkl. dem Menschen, besonders mit Rücksicht auf die Bildung des Rückenmarks, des Zöloms und der entodermalen Kloake nebst einem Exkurs über die Entstehung der Spina bifida in der Lumbosakralregion. I—V, Gegenbaurs Morphol. Jahrb., Bd. 54—55, 1925.
- Die zweifache Bildungsweise des zentralen Nervensystems bei den Wirbeltieren. Eine formgeschichtliche und materialgeschichtliche Analyse. *Roux' Arch.*, Bd. 129, 1933.
 - Groddbladsläran från medicinsk synpunkt. Nord. med. tidskr., Bd. 11, 1936.
 - Neue Gesichtspunkte zur frühen Embryonalentwicklung. Upsala Läkareförs. förh., N. F., Bd. 42, 1936.
 - Die Morphogenese des Vertebratorganismus vom formalen und experimentellen Gesichtspunkt. *Roux' Arch.*, Bd. 139, 1939.
 - Die formalen Verhältnisse während der Entwicklung der Rumpfschwanzknospe beim Huhn. Verhdl. der Anat. Ges., Anat. Anz., Bd. 88, 1939.
- Hörstadius, S.*: *Hans Spemanns* verk. Medic. fören:s tidskr., H. 11, 1935.
- Kaphka*: Nach *I. Hedenberg*.
- Karronen, E.*: Ein Fall von operiertem retroperitonealem Teratom. Duodecim, 50, 1934, s. 251.
- Kingsbury, B. F.*: The »law« of cephalocaudal differential growth in its application to the nervous system. J. comp. neur., Bd. 56, 1932.
- Pasteels, J.*: Analyse des mouvements morphogénétiques de gastrulation chez les oiseaux. Bull. cl. sci. Bruxelles, Bd. 22, 1936.
- Études sur la gastrulation des vertébrés méroblastiques. I. Téléostéens. Extr. des arch. de biol., Bd. 47, 1936.
 - Études sur la gastrulation des vertébrés méroblastiques. II. Reptiles. Extr. des arch. de biol., Bd. 48, 1937.
 - Études sur la gastrulation des vertébrés méroblastiques. III. Oiseaux. IV. Conclusions générales. Extr. des arch. de biol., Bd. 48, 1937.
- Peter, K.*: Betrachtung über die Aufgaben der Keimblätter. Z. mikrosk.-anat. Forsch., Bd. 5, 1926.
- Ein Dottersackbruch bei einem Eidechsenembryo, entstanden im Bereich der sekundären Körperbildung. Z. mikrosk.-anat. Forsch., Bd. 35, 1934.
 - Indirekte (primäre) und direkte (sekundäre) Körperentwicklung bei der Eidechse. Z. mikrosk.-anat. Forsch., Bd. 36, 1934.
 - Die Genese des Entoderms bei den Wirbeltieren. Erg. der Anat. u. Entw. gesch., Bd. 33, 1941.

- Spemann, H.*: Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung. Berlin 1936.
- Vogt, W.*: Über Wachstum und Gestaltungsbewegungen am hinteren Körperende der Amphibien. *Anat. Anz.*, Bd. 61, Erg.-H., 1926.
- Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung. II. Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. *Roux' Arch.*, Bd. 120, 1929.
 - Die Rumpfschwanzknospe bei Amphibien und die Theorie der sekundären Körperentwicklung (*Holmdahl*). *Verhdl. der Anat. Ges.* 1939.
- Wetzel, R.*: Neue Experimente zur Frühentwicklung des Huhnes. *Anat. Anz.*, Bd. 67, Erg.-H., 1929.
- Untersuchungen am Hühnchen. Die Entwicklung des Keimes während der ersten beiden Bruttage. *Roux' Arch.*, Bd. 119, 1929.
 - Urmund und Primitivstreifen. *Erg. Anat.*, Bd. 29, 1931.
 - Primitivstreifen und Urkörper nach Störungsversuchen am 1—2 Tage bebrüteten Hühnchen. *Roux' Arch.*, Bd. 134, 1936.

ABSTRACTS — ANALYSES — REFERATE.

Wienbeck, Joachim: *Die menschliche Leukämie (Leukose) und die leukämischen Veränderungen*. 98 S. Gustav Fischer. Jena 1942.
Hft. 10 RM.

A comparison is made between leukaemoid conditions and leukaemia, based on a limited number of cases (6 cases of leukaemoid (myeloid) pictures, three of which are erythroblastic anaemia of the new-born or fully developed erythroblastic anaemia in the foetus, which cannot be regarded as typical representatives of »leukaemoid pictures«).

In the introduction and in the review of the available literature, — in fact the weakest parts of his book (containing a few regular misunderstandings), the author looks over the points of view which are in his opinion current to-day. The bibliography is rather incomplete (chiefly German), and in various respects insufficient (e. g.: in the chapter dealing with myelomatosis *Magnus Levy* is not mentioned). As to the American research of recent years having so greatly contributed to increasing our knowledge of these diseases, mention is made of only a very few of them.

In the next chapter: Own investigations, several interesting observations are related. As the main result of these studies, the author cites a. o. that in the myeloid leukaemoid pictures the structure of the bone-marrow is intact, whereas in myeloid leukaemia it is altered or destroyed. Further, that in the case of leukaemoid pictures, the extra-medullary haemopoiesis arises autochthonously by mesenchymal cells, whereas in the case of leukaemia the infiltrates more likely are metastatic. However, the investigations do not exclude that an autochthonic cell formation takes place in leukaemia too, besides the metastatic one already mentioned.

The author seems to have overlooked the characteristic fact, to which *Barnes and Sisman* (1939) have called attention, viz.: that in the leukaemoid picture, unlike what is the case in leu-

kaemia, erythropoiesis in the extra-medullary foci is found. According to the descriptions, the same is true in the cases of the three grown-up patients with myeloid-leukaemic pictures in the author's material.

The author concludes from his investigations that the leukaemias must be regarded as tumour-like malignant affections.

Taken as a monograph, the book is not quite satisfying, but to the readers specially interested in the topic, it contains valuable observations.

J. Engelbreth-Holm.

J. U. Duerst: Die Ursachen der Entstehung des Kropfes.

Verlag Hans Huber. Bern 1941. 538 S. Preis 24 schw. Fr., 14,40 RM.

Der Verfasser, der Professor der Hygiene und Zootechnik sowie Dozent für Haustierphysiologie in Bern ist, ist durch langjährige Studien zu der Auffassung gekommen, dass die Hauptursache des Strumas in dem herabgesetzten Sauerstoffgehalt oder dem erhöhten Kohlensäuregehalt der Einatemungsluft besteht; denn es ist seiner Ansicht nach die Funktion der Gl. thyroidea, den Luftstoffwechsel zu regulieren. Ob die Art des Strumas parenchymatös oder kolloid ist, hänge davon ab, inwieweit der betreffende Organismus überwiegend alkalotisch oder azidotisch eingestellt ist. So findet sich beim Mb. Basedowii nach Ansicht des Verf.'s, für welche jedoch keine nähere Begründung gegeben wird, stets ein azidotischer Zustand vor. Verschiedene Mineral- und Nahrungsstoffe können daher im gegebenen Falle kropferzeugend wirken, je nachdem sie »positivierend« oder »negativierend« seien. Die Lufterlektrizität, z. B. das Feld zwischen der Erde und dem Mond, spiele auch eine Rolle. Die Jodwirkung auf das Struma wird in der Weise erklärt, dass Jod der Stoff sei, der am besten Sauerstoff zu ersetzen vermag.

Das ganze Buch ist stark polemisch von einer ganz bestimmten, vorausgefassten Meinung aus geschrieben, und von der Literatur werden nur solche Arbeiten mitaufgeführt, die die Auffassung des Autors zu unterstützen vermögen. Der Referent hat keine genügende biochemische Schulung, als dass er wagen könnte, eingehender Stellung zu den vorgebrachten Theorien über die Aziditätsverhältnisse im Körper zu nehmen, sondern möchte nur hervorheben, dass sie sehr stark davon abweichen, was von autoritativer Seite hierzu-lande gelehrt wird. Als Beispiel sei erwähnt, dass die Bindung

des CO_2 an das Blutplasma nach Verf. in erster Linie auf eine direkte elektrochemische Affinität zwischen CO_2 und Wasser zurückzuführen sei und »nicht auf die Puffersysteme des Plasmas«, sowie dass den wichtigsten Teil der Alkalireserve bei den meisten Tieren das Kalzium darstelle. Fernerhin soll Kalium typisch radioaktiv sein (Betastrahlen aussenden) und deshalb »ansäuernd« und nicht alkalisierend wirken.

Eine grosse Anzahl der im Laufe der Jahre vorgebrachten Kropftheorien sind davon geprägt, dass das Leiden in den betroffenen Ländern so verbreitet ist, dass es auf Faktoren beruhen muss, welche die gesamte Bevölkerung betreffen. Die Forscher in diesen Gebieten vergessen dann, dass trotz allem die ätiologischen Momente nicht solche sein können, die in gleich hohem Grade ausserhalb wie innerhalb der Endemiebezirke vorkommen. Der Verf. hat diesen Punkt nicht ganz übersehen und deshalb die Jodtheorie als ein Sicherheitsventil für sein System eingebaut. Der schädlichen Wirkung von zu wenig Sauerstoff oder zu viel Kohlensäure wirke eine reichliche Jodzufuhr entgegen. Selbst wenn man hiermit einverstanden ist, erscheint es mir doch merkwürdig, dass nicht gewisse Berufe wie z. B. Heizer, Wirte in kleinen Gastwirtschaften, die ihr ganzes Leben lang in einer kohlenensäurereichen Atmosphäre verbringen (schlechte Auslüftung, Heizung, Tabaksrauch, Bier, Mineralwasser), sowie Förster, die mitten in dem nach Verf. stark kohlenensäureproduzierenden Walde wohnen, selbst in Gegenden mit günstigen Jodverhältnissen eine weit grössere Kropfhäufigkeit aufweisen als andere Menschen. Es ist auch schwierig, die sporadischen Schilddrüsenerkrankungen unter die Theorie einzuordnen. Wie will man sich z. B. vorstellen, dass eine Person als einzige in einem Haushalt längere Zeit hindurch einem Sauerstoffmangel oder einem Kohlensäureüberschuss ausgesetzt sein soll? Nach den Theorien des Verf.'s lassen sich Höjer's Funde leicht erklären, indem diese auf den Wechsel im Kohlensäuregehalt der Luft an verschiedenen topographischen Punkten zurückgeführt werden.

Eine eigenartige Konsequenz des Systemes ist Verf.'s (leider nicht begründete) Basedowtherapie. Der Patient soll eine Luft einatmen, die 15 % weniger Sauerstoff als normal enthält, und zugleich eine alkalisierende Diät einhalten.

Auf dem Gebiet, auf dem der Referent besonders bewandert ist, der Vererblichkeit des Kropfes, werden ebenfalls eine Reihe merkwürdige Anschauungen vorgebracht. Erstens sind die Literaturwiedergaben äusserst zufällig und verstreut. Die meisten grösseren, älteren und die beiden einzigen modernen Arbeiten, die bei Erscheinen des Buches vorlagen, sind nicht erwähnt, obgleich sie in den gebräuchlichen deutschen Lehrbüchern zitiert sind. Von Vallery-

Radot wird ein kleiner Artikel besprochen, dagegen nicht seine umfangreiche Abhandlung über das Thema usw. Zweitens scheint Verf. anzunehmen, dass chromosomale Vererbung beim Menschen fast gar nicht vorkommt, und dass die meisten anscheinend erblichen Krankheiten von einer Beschädigung des mütterlichen Protoplasmas herrühren, die durch die Eizelle auf die Nachkommenschaft übergeht. Hämophilie soll in dieser Weise übertragen werden und im übrigen auf eine Schilddrüsenschädigung zurückzuführen sein. Diese Auffassung, mit welcher Verf. wohl ziemlich allein steht, wird ausschliesslich damit begründet, dass er einmal imstande gewesen ist, durch sehr kräftige und langdauernde Schilddrüsenzufuhr oder durch Fütterung mit grossen Dosen Lugolsche Lösung eine Blutungstendenz bei Kühen hervorzurufen. Verf. glaubt, dass eine Keimschädigung bei der Mutter das Kind zum Bluter mache, spricht sich aber nicht darüber aus, weshalb nur die Söhne Bluter werden, und wie es kommt, dass deren Töchter wieder Konkurrenten werden.

Dass endemisches Struma in erster Linie auf exogene Faktoren zurückzuführen ist, hat Eugster mit Hilfe seiner Zwillingsuntersuchungen endgültig entschieden, obschon gerade seine Ergebnisse auch zeigten, wie der Genotypus die Form und Lokalisation des Kropfes beeinflussen kann; aber damit ist nichts über die sporadischen Fälle gesagt. Die unzweifelhafte Häufung von Basedow- und Strumafällen bei Angehörigen von Basedowpatienten muss von Vererbung und nicht von Keimschädigung herrühren, was teils daraus hervorgeht, dass die Kombination Mutter-Tochter verhältnismässig selten ist, teils daraus, dass sozusagen niemals alle Geschwister angegriffen werden, und teils auch daraus, dass die Krankheit sich erst recht spät im Leben entwickelt.

Die gediegensten Teile des Buches sind die Beschreibung des Aussehens der Gl. thyroidea bei allen den verschiedenen Tierklassen, die überhaupt ein solches Organ haben, sowie die lange Reihe von Analysen für O_2 und CO_2 in atmosphärischer Luft von verschiedenen Lokalitäten, welche zeigen, dass der Gehalt der Atmosphäre an diesen Luftarten sehr beträchtlich variiert. Das Werk ist als ein Handbuch in Strumafällen für praktische Ärzte gedacht, kann aber in dieser Eigenschaft auf Grund seiner extremen Einseitigkeit nicht empfohlen werden. Für den Spezialisten bietet es ein gewisses Interesse, indem es die Kropfprobleme unter einem neuen und überraschenden Gesichtswinkel vorführt.

Sprachlich wirkt es recht schwer und etwas unklar. Von seiten des Verlages zeigt es eine ansprechende, solide Ausstattung.

E. Bartels.

R. Bieling & M. Nordmann: »Kriegserfahrungen zur Pathologie und Therapie des Gasbrandes.« 80 pages, 17 illustrations. Gustav Fischer, Jena 1941. Price Rm. 6.00 (paper cover).

Considering the prevailing conditions, the authors have carried through a thorough clinical as well as bacteriological and pathologic-anatomical study on the cases of gas gangrene encountered in a large section of the western front from the outbreak of the war to the armistice with France. In addition, experimental studies were carried out on infection of guinea-pigs with anaerobic bacteria — in part in the Behringwerke's laboratories.

The clinical material is not large, comprising merely 50 unquestionable cases, 31 of which were verified by autopsy, the rest by bacteriological examination and biopsy. In spite of this small number, the authors think that only very few cases have escaped their examination. No percentage is given for the frequency of gas gangrene, but the disease appears to have been less frequent now than in the last year of the World War when the incidence was reduced to about 0.3 % of the wounded.

The histological studies bring nothing particularly new. Bacteriologically, the presence of the Welch-Fränkel bacteria was ascertained in every instance, in one case together with vibr. septique. Blood cultures usually showed bacteremia early in the disease, and the spreading of the bacteria in the surroundings of the wound was so rapid and extensive that amputation in bacteriologically healthy tissue was never practicable. In the animal experiments the processes were the same as those seen in the patients.

The authors had hoped among the infectious features of the individual anaerobes to find some pathologic-anatomical differences serviceable for differential-diagnostic purposes, but in this they were not successful; the variations were only small and indefinite. The animal experiments were carried out with broth cultures and toxins. Dry toxins of known toxicity were employed, but the various toxin fractions were not investigated. Therapeutically antitoxic serum had an unquestionable effect in the animal experiments. As the effect was specific, directed only against the homologous bacteria, the authors were able in protective tests with monovalent sera to differentiate between various strains.

The most important part of the book deals with the serum prophylaxis at the front. In extensive injuries where gas gangrene is likely to develop a subcutaneous injection of 20 cc. of polyvalent antitoxic serum should be given at once. The authors hold

that intravenous injection is preferable if possible. Later, in the base hospital, serum is given again, up to 100 cc., intravenously. No injection should be given into the surroundings of the wound — in order not to promote necrosis by increasing the tension in the tissues. By energetic prophylaxis with the best sera obtainable (the antitoxin content should be very high, especially against the Welch-Fränkel toxin) the authors think the gas gangrene infections may be reduced considerably though hardly to the same extent as tetanus.

The chemotherapy is mentioned but briefly. According to their experimental findings the authors think it is safe to expect some benefit only from the employment of mesudin. This remedy was employed in some cases, prophylactically (1 g.) and therapeutically (1 g. \times 3 daily; no large dose) together with serum. In a few cases the authors think they have seen a favorable effect, but owing to the small size of their material they desist from judging of this.

The book is well written and stamped by the great thoroughness of the authors, which sometimes results in unnecessary repetitions. It is no exhaustive monograph, yet it presents the problems of gas gangrene so comprehensively that it can be recommended to surgeons as well as to pathologists, besides to the army surgeons for whom it is written primarily.

V. Sindbjerg-Hansen.

INDEX

VOL. XIX FASC. 1—4.

ANTIGENBEZIEHUNGEN ZWISCHEN PNEUMOKOKKEN UND SALMONELLA-BAKTERIEN, ÜBER — —, von F. Kauffmann und A. Langvad-Nielsen	108
BLUTGRUPPENFREQUENZEN HERGELEITETEN FUNKTIONEN, EINIGE FORMELN DER MITTLEREN FEHLER DER AUS DEN — —, von Bengt Jonsson	321
CANCER RESEARCH, THE GUINEA-PIG AS EXPERIMENTAL ANIMAL IN — —, by Ole Esmarch	100
CATGUT MANUFACTURE, A NEW METHOD OF STERILIZATION WITH PARTICULAR REFERENCE TO — —, by Henry M. Christensen	482
CHRONISCHE LYMPHADENOSE BEI DÄNISCHEN RINDERN, UNTERSUCHUNGEN ÜBER — —, von J. Egehoj ..	327
DANSK PATOLOGFORENINGS 3' MØDE 24/11 1941 I KØBENHAVN	310
DIAGNOSTIC ANTIPNEUMOCOCCAL SERA PRODUCED BY IMMUNIZATION WITH ONE OR MORE TYPES OF THE PNEUMOCOCCUS, by Erna Mörch	497
DYSENTERIE-GRUPPE, ZUR SEROLOGIE DER — —, von F. Kauffmann	53
Eisen bei Mutter und Kind von H. Albers	319
ENDOKARDMYXOME, ÜBER SOG., — —, von Nils Ringertz ..	262
Entstehung des Kropfes, Die Ursachen der — —, von J. U. Duerst	622
EXPERIMENTAL INFECTION OF A HUMAN WITH FUSO-BACTERIUM FROM A BRAIN ABSCESS, by Johs. Boe ..	591
FERMENTATION MUTATIVE DES BACTÉRIES, RECHERCHES SUR LA — —, par Martin Kristensen	537
HEREDITARY DWARFISM IN MICE V, STUDIES ON — —, by Jorgen Grunnet	563

ISOHÄMAGGLUTINATION IM OCHSENBLUT, DER EINFLUSS DER VERSUCHSTEMPERATUR AUF DIE — —, von <i>O. Hardt</i>	198
KALBSHYPOPHYSENTTRANSPLANTATE BEI DER RATTE, EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG ÜBER — —, von <i>A. Westman</i> und <i>D. Jacobsohn</i>	34
Leukämie (Leukose) und die leukämischen Veränderungen, Die menschliche — —, von <i>Joachim Wienbeck</i>	621
LISTERELLA INFECTION IN LAMB, A CASE OF — —, by <i>Aage Jepsen</i>	423
METASTASIS PROBLEM, ON THE — —, by <i>Jorgen Ostensfeld</i>	209
METHYLCHOLANTHRENE IN SOME ORGANS OF THE RAT, DEPOSITION OF — —, by <i>Ole Esmarch</i>	79
MORPHOLOGY OF PERIPNEUMONIA VIRUS, AGALACTIA VIRUS AND SEIFFERTS MICROBES, ON THE — —, by <i>J. Ørskov</i>	586
MUCIN-INFEKTIONEN BEI CHEMOTHERAPEUTISCHEN UNTERSUCHUNGEN, ANWENDUNG VON — —, von <i>V. Sindbjerg-Hansen</i>	165
MUCIN 1701 W ON INFECTION WITH SHOPE FIBROMA AND VACCINIA VIRUSES, THE INFLUENCE OF — —, by <i>Johannes Clemmesen</i> and <i>Else Krag Andersen</i>	173
MULTIPLE NEUROFIBROMATOSE, EINE ERBLICHE KRANKHEIT MIT ÜBERGÄNGEN IN ANDERE GESCHWULSTFORMEN (GLIOMATOSE, SPINDELZELLENSARKOM, HÄMANGIOSARKOM), von <i>Francis Harbitz</i>	448
MYOBLASTENMYOM, ÜBER DAS SOG. —, von <i>Nils Ringertz</i>	112
PARK WILLIAMS STRAIN NO. 8, THE TYPE-CLASSIFICATION OF — —, by <i>C. Tarnowski</i>	300
Pathologie und Therapie des Gasbrandes, Kriegserfahrungen zur — —, von <i>R. Bieling</i> & <i>M. Nordmann</i>	625
PELLAGRA-PRODUCING DIET IN DOGS, WITH SPECIAL REFERENCE TO THE HISTOLOGICAL CHANGES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM, STUDIES ON THE EFFECT OF A — —, by <i>Hans Jensenius</i> and <i>Flemming Norgaard</i>	433
PERIARTERITIS NODOSA DER PULMONALARTERIE UND PRIMÄRE PULMONALSKLEROSE, von <i>Viggo Eskelund</i> ..	13
PNEUMOCOCCAL IMMUNITY. I, STUDIES IN — —, by <i>Ove Möller</i>	379
PNEUMOCOCCAL IMMUNITY. II, STUDIES IN — —, by <i>Anders Grönwall</i> and <i>Gösta Vahlne</i>	390
PNEUMOCOCCAL IMMUNITY. III, STUDIES IN — —, by <i>S. Sjöstedt</i> , <i>G. Vahlne</i> and <i>N. Berg</i>	405

POLYVALENTE IMMUNSEREN ZUR SALMONELLA-DIAGNOSE, ÜBER — —, von <i>F. Kauffmann</i>	248
SALMONELLA-TYPEN, ÜBER WEITERE NEUE — —, von <i>F. Kauffmann</i>	523
SCILDDRÜSE NACH HYPOPHYSENSTIELDURCHTRENNUNGEN BEIM KANINCHEN, ÜBER DIE STRUKTUR DER — —, von <i>A. Westman, D. Jacobsohn und H. Okkels</i>	42
SERUMFÄLLE, ÜBER —, von <i>Arne Gammelgaard</i>	1
STREPTOBACILLUS MONILIFORMIS AND THE MORPHOLOGY OF ITS VARIANTS, by <i>J. Ørskov</i>	575
TERATOMGENESE, BEITRAG ZUR FRAGE VON DER —, von <i>D. E. Holmdahl</i>	603
TULAREMIA IN SWEDEN, THE OCCURRENCE AND MODE OF TRANSMISSION OF — —, by <i>Gunnar Olin</i>	220
ZÜCHTUNG VON MENINGOKOKKEN UND ANDEREN BAKTERIEN AUS SPINALFLÜSSIGKEITEN, DIE BEDEUTUNG DER KOHLENSÄURE FÜR DIE — —, von <i>N. Harhoff</i>	184

<i>Andersen, Else Krag and Clemmesen, Johannes: The Influence of »Mucin 1701 W« on Infection with Shope Fibroma and Vaccinia Viruses</i>	173
<i>Berg, N., Sjöstedt, S. and Vahlne, Gösta: Studies in Pneumococcal Immunity. III</i>	405
<i>Boe, Johs.: Experimental Infection of a Human with Fusobacterium from a Brain Abscess</i>	591
<i>Clemmesen, Johannes and Andersen, Else Krag: The Influence of »Mucin 1701 W« on Infection with Shope Fibroma and Vaccinia Viruses</i>	173
<i>Christensen, Henry M.: A New Method of Sterilization with particular reference to Catgut Manufacture</i>	482
<i>Dansk Patologforenings 3' Mode 24/11 1941 i København</i>	310
<i>Egehoj, J.: Untersuchungen über chronische Lymphadenose bei dänischen Rindern</i>	327
<i>Eskelund, Viggo: Periarteriitis nodosa der Pulmonalarterie und primäre Pulmonalsklerose</i>	13
<i>Esmarch, Ole: Deposition of Methylcholanthrene in Some Organs of the Rat</i>	79
<i>Esmarch, Ole: The Guinea-pig as Experimental Animal in Cancer Research</i>	100
<i>Gammelgaard, Arne: Über Serumfälle</i>	1
<i>Grunnet, Jørgen: Studies on Hereditary Dwarfism in Mice. V.</i>	563

<i>Grönwall, Anders and Vahlne, Gösta: Studies in Pneumococcal Immunity. II</i>	390
<i>Harbitz, Francis: Multiple Neurofibromatose, eine erbliche Krankheit mit Übergängen in andere Geschwulstformen (Gliomatose, Spindelzellensarkom, Hämangiosarkom)</i>	448
<i>Harhoff, N.: Die Bedeutung der Kohlensäure für die Züchtung von Meningokokken und anderen Bakterien aus Spinalflüssigkeiten</i>	184
<i>Hardt, O.: Der Einfluss der Versuchstemperatur auf die Isohämagglutination im Ochsenblut</i>	198
<i>Holmdahl, D. E.: Beitrag zur Frage von der Teratomgenese.</i>	603
<i>Jacobsohn, D. und Westman, A.: Experimentelle Untersuchung über Kalbshypophysentransplantate bei der Ratte</i>	34
<i>Jacobsohn, D., Westman, A. und Okkels, H.: Über die Struktur der Schilddrüse nach Hypophysenstiöldurchtrennungen beim Kaninchen</i>	42
<i>Jensenius, Hans and Norgaard, Flemming: Studies on the Effect of a Pellagra-Producing Diet in Dogs, with special reference to the Histological Changes in the Central Nervous System</i>	433
<i>Jepsen, Aage: A Case of Listerella Infection in Lamb.</i>	423
<i>Jonsson, Bengt: Einige Formeln der mittleren Fehler der aus den Blutgruppenfrequenzen hergeleiteten Funktionen</i>	321
<i>Kauffmann, F.: Zur Serologie der Dysenterie-Gruppe.</i>	53
<i>Kauffmann, F. und Langvad-Nielsen, A.: Über Antigenbeziehungen zwischen Pneumokokken und Salmonella-Bakterien</i>	108
<i>Kauffmann, F.: Über polyvalente Immunseren zur Salmonella-Diagnose</i>	248
<i>Kauffmann, F.: Über weitere neue Salmonella-Typen.</i>	523
<i>Kristensen, Martin: Recherches sur la fermentation mutative des bactéries</i>	537
<i>Langvad-Nielsen, A. und Kauffmann, F.: Über Antigenbeziehungen zwischen Pneumokokken und Salmonella-Bakterien</i>	108
<i>Möller, Ove: Studies in Pneumococcal Immunity. I.</i>	379
<i>Mörch, Erna: Diagnostic Antipneumococcal Sera produced by Immunization with One or More Types of the Pneumococcus</i>	497
<i>Norgaard, Flemming and Jensenius, Hans: Studies on the Effect of a Pellagra-Producing Diet in Dogs, with special reference to the Histological Changes in the Central Nervous System</i>	433
<i>Okkels, H., Westman, A. und Jacobsohn, D.: Über die Struktur der Schilddrüse nach Hypophysenstiöldurchtrennungen beim Kaninchen</i>	42

<i>Olin, Gunnar</i> : The Occurrence and Mode of Transmission of Tularemia in Sweden.....	220
<i>Ostenfeld, Jorgen</i> : On the Metastasis Problem.....	209
<i>Ringertz, Nils</i> : Über das sog. Myoblastenmyom.....	112
<i>Ringertz, Nils</i> : Über sog. Endokardmyxome.....	262
<i>Sindbjerg-Hansen, V.</i> : Anwendung von Mucin-Infektionen bei chemotherapeutischen Untersuchungen	165
<i>Sjöstedt, S., Vahlne, G. and Berg, N.</i> : Studies in Pneumococcal Immunity. III	405
<i>Tarnowski, C.</i> : The Type-classification of Park Williams Strain No. 8	300
<i>Vahlne, Gösta and Grönwall, Anders</i> : Studies in Pneumococcal Immunity. II	390
<i>Vahlne, G., Sjöstedt, S. and Berg, N.</i> : Studies in Pneumococcal Immunity. III.	405
<i>Westman, A. und Jacobsohn, D.</i> : Experimentelle Untersuchung über Kalbshypophysentransplantate bei der Ratte	34
<i>Westman, A., Jacobsohn, D. und Okkels, H.</i> : Über die Struktur der Schilddrüse nach Hypophysenstiieldurchtrennungen beim Kaninchen	42
<i>Orskov, J.</i> : <i>Streptobaccillus Moniliformis</i> and the Morphology of its Variants.....	575
<i>Orskov, J.</i> : On the Morphology of Peripneumonia Virus, Aga- lactia Virus and Seiffert's Microbes.....	586

SUPPLEMENTA

Supplementum XLV: *Ivar Behring*: Die Rekonstruktion tödlich ver-
laufener Kraftverkehrsunfälle. 1942.